UNTERSUCHUNGEN ZUR METABOLISCHEN AKTIVIERUNG VON VINYLBROMID UND VINYLCHLORID

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Hubert Ottenwälder
aus Lauterwasser

1979

UNTERSUCHUNGEN ZUR METABOLISCHEN AKTIVIERUNG VON VINYLBROMID UND VINYLCHLORID

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Hubert Ottenwälder
aus Lauterwasser

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:		30. Juli 1979
Dekan	:	Prof. Dr. M. Hanack
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. Dr. H.M. Bolt
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. U. Weber

Die Arbeit wurde am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen, Direktor Prof. Dr. H. Remmer, dem ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes danke, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Hermann M. Bolt durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bolt danke ich für die Überlassung des Themas und für die großzügige und intensive Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche. Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, besonders Herrn Dipl.-Biochem. R. J. Laib und Herrn Priv.-Doz. Dr. A. Buchter (Köln), für zahlreiche Anregungen und kritische Diskussionen, sowie Fräulein Ulrike Heni für ihre sorgfältige Assistenz bei der Durchführung der Versuche.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Herren Prof. C. E. Sekeris und Dr. E. Hofer am Institut für Zellforschung am Deutschen Krebsforschungsinstitut, Heidelberg, die es bereitwillig ermöglichten, dort Versuche durchzuführen, sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Decker für ihre freundliche und intensive Einführung in ihre Arbeitsmethoden.

Nicht zuletzt möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken, die durch eine Sachbeihilfe (AZ.: Bo 549/2) die Durchführung der Arbeit unterstützte.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Biochemische Aspekte des Metabolismus von Vinylbromid und Vinylchlorid	2
1.2.	Zellbiologische Aspekte der karzinogenen Wirkung von Vinylbromid und Vinylchlorid	4
2.	MATERIAL	7
2.1.	Versuchstiere und Tierhaltung	7
2.2.	Chemikalien	7
2.2.1.	Enzyme, Coenzyme, Nukleoside und Nukleinsäuren	7
2.2.2.	Sonstige nichtradioaktive Substanzen	8
2.2.3.	Radioaktive Substanzen	9
2.3.	Geräte und Materialien	9
2.3.1.	Zentrifugen	9
2.3.2.	Optische Geräte	9
2.3.3.	Sonstige Geräte und Materialien	10
3.	METHODEN	11
3.1.	Radioaktivitätsmessungen	11
3.1.1.	Szintillatoren für die Flüssigkeitsszintillationszählung	11
3.1.1.1.	Bray'scher Szintillator	11
3.1.1.2.	Toluolszintillator	11
3.1.1.3.	Aquasol^{R}	12
3.1.2.	Flüssigkeitsszintillationszählung	12
3.1.2.1.	Standardmethode	12
3.1.2.2.	Methode für gasförmige Proben	12
3.1.2.3.	Methode für großvolumige Proben	13
3.2.	Expositionssysteme	13
3.2.1.	Exposition gegen ^{14}C-Vinylbromid	13
3.2.2.	Exposition gegen Vinylbromid	15

		Seite
3.3.	Alkylierung von Proteinen und Nukleinsäuren in vitro	15
3.3.1.	Alkylierung von Nukleinsäuren in vitro	15
3.3.2.	Proteinalkylierung in Hepatocyten und Sinusoidalzellen	17
3.4.	Metabolisierung und Proteinbindung von ^{14}C-Vinylbromid und ^{14}C-Vinylchlorid durch Hepatocyten und Sinusoidalzellen	17
3.4.1.	Simultanisolierung von Hepatocyten und Sinusoidalzellen	19
3.4.1.1.	Benötigte Medien	19
3.4.1.2.	Isolierung	20
3.4.2.	Viabilitätsbeurteilung	21
3.4.3.	Inkubation mit ^{14}C-Vinylbromid und ^{14}C-Vinylchlorid	21
3.4.4.	Bestimmung der kovalent gebundenen Metabolite	22
3.4.4.1.	Proteinextraktion und Radioaktivitätsmessung	22
3.4.4.2.	Auswertung der Radioaktivitätsmessungen	22
3.5.	Alkylierung von Nukleinsäuren in vitro	23
3.5.1.	Präparation von Rattenlebermikrosomen	23
3.5.2.	Inkubation mit ^{14}C-Vinylbromid	24
3.5.3.	Reisolierung der alkylierten Nukleinsäuren	24
3.6.	Alkylierung von Nukleinsäuren in vivo	24
3.6.1.	Isolierung der Nukleinsäuren	25
3.6.1.1.	Benötigte Lösungen	25
3.6.1.2.	Isolierung der Gesamt-RNS	26
3.6.1.3.	Isolierung der DNS	27
3.7.	Analyse alkylierter Nukleinsäuren	28
3.7.1.	Enzymatische Nukleinsäurehydrolyse	28
3.7.1.1.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
3.7.1.2.	Hydrolyse von RNS	29
3.7.1.3.	Hydrolyse von DNS	29

Seite

3.7.2.	Analyse der Nukleinsäure-hydrolysate	30
3.7.2.1.	Analyse der RNS-Hydrolysate	30
3.7.2.2.	Analyse der DNS-Hydrolysate	31
3.8.	Messenger-RNS und Proteinbio-synthese in vitro	32
3.8.1.	Benötigte Pufferlösungen	33
3.8.2.	Isolierung Poly(A)-haltiger RNS	34
3.8.2.1.	Vorbereitende Schritte	34
3.8.2.2.	Polysomenpräparation	34
3.8.2.3.	Isolierung von RNS durch Phenolextraktion	35
3.8.2.4.	Chromatographie an Oligo(dT)-Cellulose	36
3.8.3.	Proteinbiosynthese in vitro	37
3.8.3.1.	Präparation des Weizenkeimsystems	37
3.8.3.1.1.	Isolierung des Weizenkeimextrakts	37
3.8.3.1.2.	Vorinkubation der S-30 Fraktion	38
3.8.3.2.	Translationssystem in vitro	38
3.8.3.3.	Bestimmung der Gesamtproteinsynthese	39
3.8.4.	Elektrophorese und Fluorographie	39
3.8.4.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.8.4.2.	Fluorographie	

4.	ERGEBNISSE	42
4.1.	Alkylierung von Nukleinsäuren durch reaktive Metabolite von ^{14}C-Vinyl-bromid in vitro und in vivo	42
4.1.1.	Alkylierung artifizieller Nuklein-säuren	44
4.1.1.1.	Alkylierung von Polyadenylsäure	44
4.1.1.2.	Alkylierung von Polycytidylsäure	44
4.1.2.	Alkylierung von RNS	46
4.1.2.1.	Alkylierung von RNS in vitro	46
4.1.2.2.	Alkylierung von RNS in vivo	48

Seite

4.1.3. Alkylierung von DNS 52
4.1.3.1. Alkylierung von DNS in vitro 52
4.1.3.2. Alkylierung von DNS in vivo 54
4.2. mRNS-Alkylierung und Proteinbiosynthese in vitro 56
4.2.1. Zeitabhängigkeit der Proteinbiosynthese in vitro 57
4.2.2. Bestimmung der Gesamtsynthese 58
4.2.3. Elektrophoretische Auftrennung der synthetisierten Proteine 59
4.3. Metabolisierung von ^{14}C-Vinylbromid und ^{14}C-Vinylchlorid durch Parenchym- und Sinusoidalzellen 60
4.3.1. Isolierung von Hepatozyten und Sinusoidalzellen 60
4.3.2. Inkubation mit ^{14}C-Vinylbromid und ^{14}C-Vinylchlorid und Bestimmung der kovalenten Bindung 62

5. DISKUSSION 66
5.1. Alkylierung von Nukleinsäuren durch reaktive Metabolite von Vinylbromid 66
5.2. Zur malignen Entartung von Leberzellen nach Exposition gegen Vinylbromid und Vinylchlorid 68

6. ZUSAMMENFASSUNG 70

7. LITERATURVERZEICHNIS 72

Abkürzungen

Äthenoadenosin	$1,N^6$-Äthenoadenosin 3-β-D-Ribofuranosylimidazo(2,1-i)purin
Äthenocytidin	$3,N^4$-Äthenocytidin 5,6-Dihydro-5-oxo-6-β-D-ribofuranosyl-imidazo(1,2-c)pyrimidin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
^{14}C-VBr	1,2-^{14}C-Vinylbromid
^{14}C-VC	1,2-^{14}C-Vinylchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol (threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)
EGTA	Äthandioxy-bis-(äthylamin)-tetraessig-säure
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyäthyl)-1-piperazino)-äthansulfonsäure
hnRNS	Heterogene Kern-Ribonukleinsäure
Ipm	Impulse pro Minute
LDH	Lactat-Dehydrogenase
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
$NADP^+$	β-Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH	β-Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat, reduzierte Form
Oligo(dT)-Cell.	5'-Phospho-(2'-desoxy-thymidylyl-(3'→5')$_n$-desoxythymidin-Cellulose
Poly(A)	Polyadenylsäure
Poly(C)	Polycytidylsäure

POPOP	1,4-Bis-(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzol
ppm	parts per million
PPO	2,5-Diphenyl-oxazol
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
VBr	Vinylbromid
VC	Vinylchlorid
Zpm	Zerfälle pro Minute

1. EINLEITUNG

Im Jahre 1970 wurde erstmalig gefunden, daß Vinylchlorid (VC) kanzerogen wirkt (104,105). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß Vinylchlorid Tumoren in verschiedenen Organen auslösen kann, insbesondere Lebertumoren endothelialen Ursprungs (70,71). Für diese beim Menschen sonst selten auftretende Tumorart konnten erstmals CREECH und JOHNSON (25) einen kausalen Zusammenhang zwischen beruflicher Exposition gegen Vinylchlorid und Tumorentstehung nachweisen. Bei allen seither beschriebenen Fällen von Lebertumoren beim Menschen, ausgelöst durch Exposition gegen Vinylchlorid, handelte es sich - mit einer Ausnahme (33) - um Hämangioendotheliome (19,26,28,45,62,64,67,78,89,91,101,102,107, 114). Sie entstehen durch maligne Transformation nichtparenchymatöser Zellen der Leber, im engeren Sinne der Sinusoidalzellen.

Das dem Vinylchlorid analoge Vinylbromid wird in den USA zur Herstellung schwer entflammbarer Polymerer industriell verwendet. Deshalb ergab sich die Notwendigkeit einer gezielten toxikologischen und biochemischen Untersuchung auch dieser Substanz. Vorläufige Ergebnisse eines derzeit in den USA laufenden Karzinogenitätstestes zeigen, daß auch Vinylbromid bei Ratten Angiosarkome der Leber erzeugt; diese Tumoren sind histologisch mit den nach Exposition gegenüber Vinylchlorid gefundenen Tumoren identisch (44).

Eigene Untersuchungen zur Entstehung präneoplastischer hepatozellulärer Areale nach Exposition neugeborener Ratten gegenüber Vinylchlorid und Vinylbromid zeigten darüber hinaus, daß an diesem Tiermodell eine deutliche onkogene Potenz von Vinylbromid nachweisbar ist, die jedoch fast um den Faktor 10 niedriger liegt, als die von Vinylchlorid (15)

Da sowohl Vinylchlorid als auch Vinylbromid in die Reihe der Kanzerogene einzuordnen ist, die erst nach einer metabolischen Umwandlung im Organismus das ultimal wirksame

kanzerogene Produkt bilden (3), erscheint in diesem Zusammenhang der von FILSER (29) erhobene Befund von Bedeutung, daß Vinylbromid bei der Ratte in vivo langsamer metabolisiert wird als Vinylchlorid.

1.1. Biochemische Aspekte des Metabolismus von Vinylbromid und Vinylchlorid

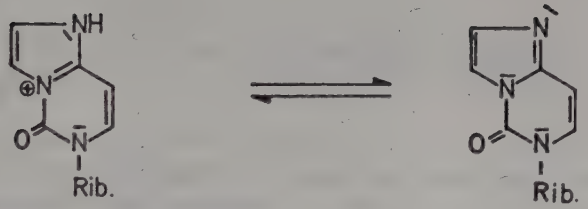
Eine Reihe neuerer Arbeiten befaßt sich mit den biochemischen Grundlagen der kanzerogenen Wirkung von Vinylchlorid (3,5,6,8,9,12,13,14,34,35,36,37,39,43,48,49,58,59,61,68,73,79,81,88,108,109,110,111).

In unserem eigenen Arbeitskreis konnte LAIB 1979 (57) zeigen, daß Vinylchlorid durch mikrosomale Monooxygenasen der Leber in reaktive Intermediärprodukte überführt wird, die kovalent an funktionelle Gruppen von Makromolekülen binden. In der Theorie der chemischen Karzinogenese wird der Alkylierung der DNS durch chemische Karzinogene bzw. deren Metabolite eine große Bedeutung zugemessen. Man sieht in diesem Ereignis die "biochemische Primärläsion", die nach erfolgter Zellreplikation zu einer somatischen Mutation führt. In diesem Mutationsereignis wird das initiale Moment gesehen, das den Prozeß der mutagenen Entartung auslösen kann (87).

Die Alkylierung von DNS durch reaktive Metabolite von Vinylchlorid konnte in vitro und in vivo nachgewiesen werden (57). Darüberhinaus treten nach Einwirkung von Vinylchlorid charakteristische Alkylierungsprodukte an der RNS auf, die als 1,N^6-Äthenoadenosin und als 3,N^4-Äthenocytidin identifiziert werden konnten (57),(Abb. 1). Es wurden Hinweise darauf gefunden, daß durch die Alkylierung von RNS in der Folge Veränderungen in der Translation auftreten (57).

Die im Stoffwechsel von Vinylchlorid entstehenden reaktiven Zwischenprodukte sind das Oxiran Chloräthylenoxid und des-

1,N^6-Äthenoadenosin



3,N^4-Äthenocytidin

Abb. 1: Alkylierungsderivate der Nukleoside Adenosin und Cytidin.

sen Umlagerungsprodukt Chloracetaldehyd (3,11,20,34,35,36, 39,57,108,109,110). Auf Grund theoretischer Überlegungen (11) kann angenommen werden, daß die sofortige Alkylierung mikrosomaler Proteine in erster Linie durch das äußerst reaktive und schnell zerfallende (42) Chloräthylenoxid erfolgt, während die Alkylierung zumal der DNS eher durch Chloracetaldehyd hervorgerufen werden dürfte.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die kanzerogene Wirkung von Vinylbromid auf ähnlichen Alkylierungsmechanismen beruht wie sie für Vinylchlorid nachgewiesen wurden. Hierzu wird die Alkylierung von DNS und RNS bei der Ratte in vivo sowie die Alkylierung verschiedener Nukleinsäuren in experimentellen in vitro-Systemen durch metabolisch entstehende VBr-Metabolite untersucht. Darüberhinaus wird auch im Falle des Vinylbromid gezeigt, daß die an der RNS gesetzten Läsionen Veränderungen der Proteinsynthese zur Folge haben können.

1.2. Zellbiologische Aspekte der karzinogenen Wirkung von Vinylbromid und Vinylchlorid

Es wurde bereits Eingangs erwähnt, daß die überwiegende Anzahl der nach Exposition gegen Vinylchlorid sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte gefundenen Tumoren Hämangioendotheliome (Angiosarkome) der Leber sind. Hepatozelluläre Tumoren entstehen in weitaus geringerem Maße. Die Hämangioendotheliome entstehen nach maligner Transformation nichtparenchymatöser Zellen der Leber, in erster Linie der Sinusoidalzellen.

Sinusoidalzellen stellen eine heterogene Zellpopulation dar, deren Auftrennung in bis jetzt vier unterscheidbare Zelltypen gelungen ist: Endothelzellen, Kupffer'sche Sternzellen, Fettzellen (Lipozyten) und Pitzellen (100,113). Es besteht keine einhellige Meinung darüber, ob die Tumoren aus transformierten Kupfferzellen (31) oder Endothelzellen (85, 86) entstehen.

Gänzlich unbekannt sind die biochemischen Grundlagen der bevorzugten Bildung gerade von Hämangioendotheliomen nach einer Exposition gegen Vinylchlorid. Beobachtungen von MALTONI (69) zeigen, daß bei jungen Ratten Exposition gegenüber Vinylchlorid häufiger zu hepatozellulären Karzinomen führt als bei erwachsenen Tieren. Erklärt wird dieser Befund durch

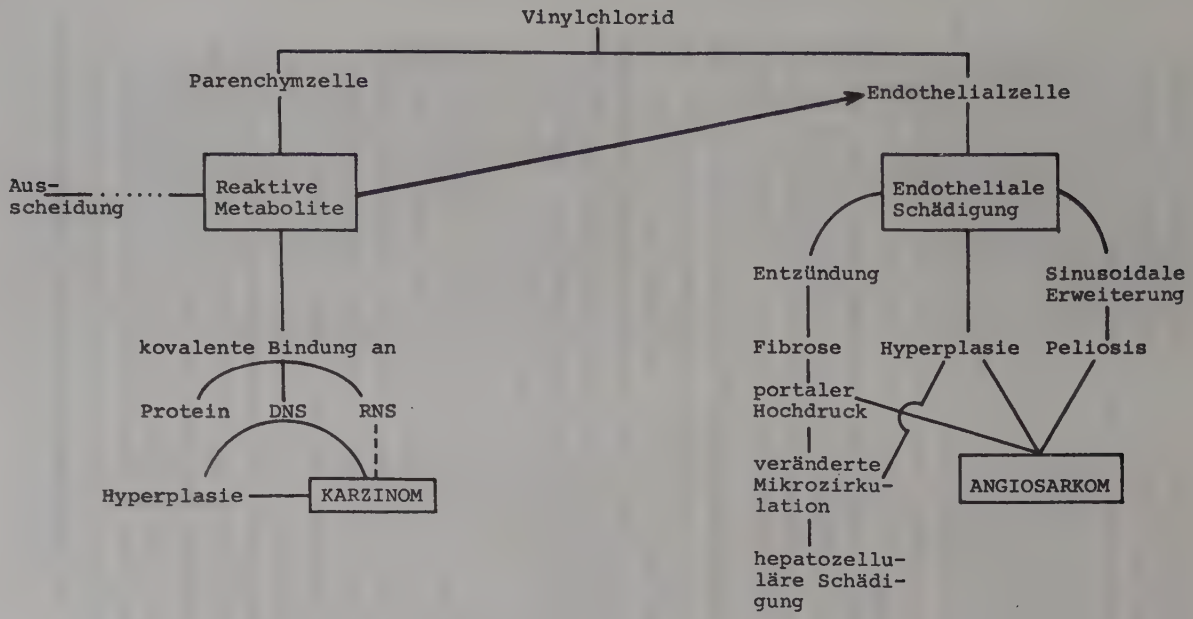


Abb. 2: Einwirkung von Vinylchlorid auf die Leber (nach (95))

die Tatsache, daß die hepatozelluläre Proliferationsrate bei sehr jungen Ratten noch hoch ist, während die Ansprechbarkeit der Hepatocyten ausgewachsener Tiere auf karzinogene Stimuli wegen der dort nur sehr geringen Zellteilungsrate niedrig ist (16). Diese Befunde und die Tatsache, daß nichtparenchymatöse Zellen eine deutlich niedrigere Metabolisierungskapazität für Fremdstoffe haben als Hepatocyten (23,75), stützen die Hypothese von POPPER (85) und SCHAFFNER (95), daß zwischen Sinusoidalzellen und Parenchymzellen eine besondere Wechselwirkung besteht derart, daß die in den Hepatocyten gebildeten reaktiven Metabolite von Vinylchlorid zumindest partiell in endotheliale Zellen gelangen und dort zu maligner Transformation führen können. Abb. 2 demonstriert diese Zusammenhänge (siehe auch (95)).

Nachdem auf Grund vorliegender Tierversuche (44) sicher ist, daß auch Vinylbromid Hämangioendotheliome der Leber hervorruft und andererseits bereits verschiedentlich (3,4) auf Gemeinsamkeiten in der metabolischen Aktivierung von Vinylbromid und Vinylchlorid hingewiesen wurde, sind ähnliche Überlegungen auch bei der Betrachtung der Kanzerogenität von Vinylbromid zugrunde zu legen.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals untersucht, ob Unterschiede hinsichtlich des Metabolismus von Vinylbromid und Vinylchlorid zwischen Hepatocyten und Sinusoidalzellen der Leber feststellbar sind. Hierzu wurden beide Zellpopulationen nach einem im Arbeitskreis K. DECKER, Freiburg, entwickelten Verfahren (55) aus jeweils derselben Rattenleber simultan isoliert und auf ihre Fähigkeit untersucht, Vinylbromid und Vinylchlorid metabolisch zu aktivieren. Die erhaltenen Daten stehen in Übereinstimmung mit der von POPPER und SCHAFFNER propagierten These, daß in der Leber nur die Parenchymzellen über die für den Metabolismus von Vinylbromid und Vinylchlorid notwendigen Enzyme verfügen und dementsprechend reaktive Metabolite die Hepatocyten verlassen und auf benachbarte Endothelzellen einwirken können.

2. MATERIAL

2.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Männliche und weibliche Wistarratten wurden von der Versuchstierzuchtanstalt S. Ivanovas, Kisslegg, bezogen. Die Tiere erhielten Leitungswasser und Standardtrockenfutter mit 20 % Protein (Altromin^{R}, Altrogge GmbH, Lage/Lippe) ad libitum. Sie wogen 180 - 220 g.

2.2. Chemikalien

2.2.1. Enzyme, Coenzyme, Nukleoside und Nukleinsäuren

Von B o e h r i n g e r Mannheim GmbH, Mannheim, wurden bezogen:
Adenin, Adenosin, d-Adenosin, Cytidin, d-Cytidin, Desoxyribonuklease I aus Rinderpankreas (Desoxyribonukleinsäure: 5'-oliognucleotidhydrolase, EC 3.1.4.5, 2000 Einheiten mg^{-1} nach Kunitz), Guanosin, d-Guanosin, Isocitrat-Dehydrogenase aus Schweineherz (threo-D_s-Isocitrat:NADP Oxidoreduktase, EC 1.1.1.42, 2 U mg^{-1}), Kreatinphosphokinase aus Kaninchenmuskel (ATP:Creatin N-phosphotransferase EC 2.7.3.2, 25 U mg^{-1}), $NADP^{+}$, NADPH, Phosphodiesterase aus Schlangengift (Oligonukleinsäure:5'-nukleotidhydrolase, EC 3.1.4.1, 52 U mg^{-1} mit UDP-Glucose als Substrat), Ribonuklease T_1 aus Aspergillus Oryzae (Ribonukleinsäure:3'-Guanyloligonukleotidhydrolase, EC 3.1.4.8, 500 000 Egami Einheiten ml^{-1}), saure Phosphatase aus Kartoffeln (Orthophosphorsäure-Monoesterphosphohydrolase, EC 3.1.3.2, 60 U mg^{-1} mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat), d-Thymidin, Uridin.

Von C a l b i o c h e m Corp., San Diego, Calif., USA wurden bezogen:
ATP, GTP, Pronase (B grade) aus Streptomyces griseus (45

proteolytische Einheiten mg^{-1}).

In E i g e n s y n t h e s e nach GREEN und HATHWAY (36) wurden hergestellt:
$1,N^6$-Ätheno-d-adenosin und $3,N^4$-Ätheno-d-cytidin

Von S e r v a , Heidelberg, wurden bezogen:
Polyadenylsäure, Polycytidylsäure

Von S i g m a Chemical Co., St. Louis, MO., USA wurden geliefert:
$1,N^6$-Äthenoadenosin, $3,N^4$-Äthenocytidin, DNS aus Kalbsthymus, RNS aus Kalbsleber.

Von W o r t h i n g t o n Biochemical Corp., Freehold, N.J., USA wurde bezogen:
Collagenase (grade II) aus Clostridium histolyticum (EC 3.4.24.3).

2.2.2. Sonstige nichtradioaktive Substanzen

Acrylamid, Serva, Heidelberg; Aminex A-6, BIO·RAD Laboratories, Richmond, Calif., USA; Aminosäuren, Serva, Heidelberg; Ammoniumformiat, Aldrich Chem., Düsseldorf; Ammoniumpersulfat, Serva, Heidelberg; Aquasol^R, NEN Corp. Boston, Mass., USA; N,N'-Bismethylenacrylamid, Bromphenolblau, DTT, Heparin-natrium, HEPES, DL-Isocitrat, Serva, Heidelberg; Kreatinphosphat, Calbiochem Corp., San Diego, Calif., USA; Oligo(dT)-Cellulose (Kettenlänge bis 18 Nukleotide), Collaborative Research Inc., Waltham, Mass., USA; Mercaptoäthanol, SDS, Serva, Heidelberg; Siliclad, Clay Adams, Parsippany, N.J., USA; Spermidin, TEMED, Triton X-100, Trypanblau, Serva, Heidelberg; Vinylbromid, EGA-Chemie, Weinheim; Vinylchlorid, Dynamit Nobel, Troisdorf; Weizenkeime "Ährenstolz", GEG, Mannheim.
Alle nichtgenannten Chemikalien waren von Merck, Darmstadt, und von p.a. Qualität.

2.2.3. Radioaktive Substanzen

1,2-^{14}C-Vinylbromid und 1,2-^{14}C-Vinylchlorid wurden von der radiochemischen Abteilung der Farbwerke Hoechst, Frankfurt, synthetisiert. Die spezifische Radioaktivität betrug 396 GBq mol^{-1} (10,7 mCi $mmol^{-1}$) für beide Substanzen. Sie wurden in Brechsiegelampullen geliefert und waren zur Erhöhung der Stabilität mit 4 Teilen Helium überlagert.

2.3. Geräte und Materialien

2.3.1. Zentrifugen

An Zentrifugen standen zur Verfügung: eine Ultrazentrifuge Spinco L-50 mit den Festwinkelrotoren Typ 30 und Typ 50 TI von Beckman Instruments GmbH, München; eine Sorvall Kühlzentrifuge RC2-B der Homuth-Vetter KG, St. Leon-Rotz, mit Festwinkelrotor SS 34 und Ausschwingrotor HB4; eine Kleinzentrifuge Labofuge I der Heraeus Christ GmbH, Osterode, sowie mehrere Tischzentrifugen der Eppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz GmbH, Hamburg.

2.3.2. Optische Geräte

Zwei UV-Einheiten, Uvicord II 8300 und Uvicord 4700 der LKB Produkter AB, Bromma, Schweden, in Kombination mit dem Fraktionensammler Ultrorac 7000 und Sechskanalschreiber der selben Firma; ein Spektralphotometer M4QIII mit Detektoreinheit PMQII und Durchflußküvette von Zeiss, Wetzlar, kombiniert mit 10 inch Recorder von Beckman Instr. GmbH, München; ein Spektrophotometer Modell 25 mit Recorder von Beckman Instr. GmbH, München.

2.3.3. Sonstige Geräte und Materialien

Filtrierpapier 2043b, Scheibendurchmesser 23 mm, Schleicher & Schüll GmbH, Dassel; Flüssigkeitsszintillationszähler Betaszint BF 5000, Berthold, Karlsruhe, mit on line Diehl-Algotronic-Rechner; Halothanverdampfer Fluotec Marc 2, Cyprane Ltd., Keighley, England; Labotron-Präzisionsstempelpumpe, Kontron Technik GmbH, München; Lyophilisator Typ 200, Christ, Aichach-Oberbernbach; Nylongewebe Monyl NY 79 HD Super 102/08, Züricher Beuteltuchfabrik AG, Rüschlikon, Schweiz; Röntgenfilm Kodak RP Royal X-Omat, Kodak, Stuttgart; Rotationsmischer 3300, Thermostat 3401, Eppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz GmbH, Hamburg; Ultraschallbad Sonorex RK 102, Bandelen Electronic KG, Berlin; Ultrathermostat K5, Colora Meßtechnik GmbH, Lorch; Visking Dialysierschlauch 27/32 und 8/32, Union Carbide, Chicago, USA; Wratten Filter Nr. 16, Kodak, Stuttgart.

3. METHODEN

3.1. Radioaktivitätsmessungen

Zur Bestimmung der Radioaktivität in wässrigen und gasförmigen Proben wurden verschiedene Szintillatoren verwendet: der Szintillator nach BRAY (21), ein Szintillator auf Toluolbasis und der kommerzielle Fertigszintillator Aquasol^{R}.

3.1.1. Szintillatoren für die Flüssigkeitsszintillationszählung

3.1.1.1. Bray'scher Szintillator

Der beschriebene Szintillator wurde leicht abgeändert:
100 g Naphthalin, 3 g PPO und 0,3 g POPOP wurden ad 1000 ml Dioxan gelöst.
Für Proben, die Protein in ungelöster Form enthielten, war der Szintillator 20 mmolar an Hyamin^{R}.

3.1.1.2. Toluolszintillator

Für nichtwässrige und gasförmige Proben von ^{14}C-Vinylbromid und ^{14}C-Vinylchlorid wurde ein Szintillator folgender Zusammensetzung verwendet: 4 g PPO wurden ad 1000 ml in Toluol gelöst.

3.1.1.3. Aquasol^{R}

Dieser kommerzielle Szintillator auf Xylolbasis wurde für alle wäßrigen Proben mit Volumina zwischen 1 ml und 3 ml verwendet.

3.1.2. Flüssigkeitsszintillationszählung

Alle Proben wurden in einem Berthold BF 5000 Flüssigkeitsszintillationszähler bei 280 K (7°C) gemessen. Die Abwesenheit von Chemolumineszenz in den Proben wurde durch Messen der "random coincidence" (KAPPUS und REMMER (51)) überprüft.

3.1.2.1. Standardmethode

Wäßrige Proben mit Volumina bis maximal 0,6 ml wurden mit 10 ml Bray'schem Szintillator versetzt, über Nacht bei 277 K (4°C) stehen gelassen und dann gemessen.

Die Zählausbeute wurde durch Zugabe von 50 µl internen Standards (^{14}C-Toluol, 1,056 x 10^{6} Zpm g^{-1} ± 2 %) bestimmt, damit die Zpm berechnet und die Ergebnisse der Messungen mit der spezifischen Radioaktivität der eingesetzten Substanzen in molare Einheiten umgerechnet.

3.1.2.2. Methode für gasförmige Proben

Da halogenierte Äthylene stark lipophil sind, wurden Proben von 1 ml oder 2 ml gasförmigen ^{14}C-Vinylbromids oder ^{14}C-Vinylchlorids mit einer 10 ml Spritze entnommen, die 2 ml Toluolszintillator enthielt. Durch einminütiges Schüt-

teln wurde die Verbindung im Szintillator gelöst, zu weiteren 8 ml Szintillator gegeben und gezählt.

3.1.2.3. Methode für großvolumige Proben

Wäßrige Proben mit Volumina zwischen 1 ml und 3 ml wurden zu 10 ml Aquasol^{R} gegeben, gut geschüttelt und, nach Stehenlassen über Nacht bei 277 K (4°C), gemessen.

3.2. Expositionssysteme

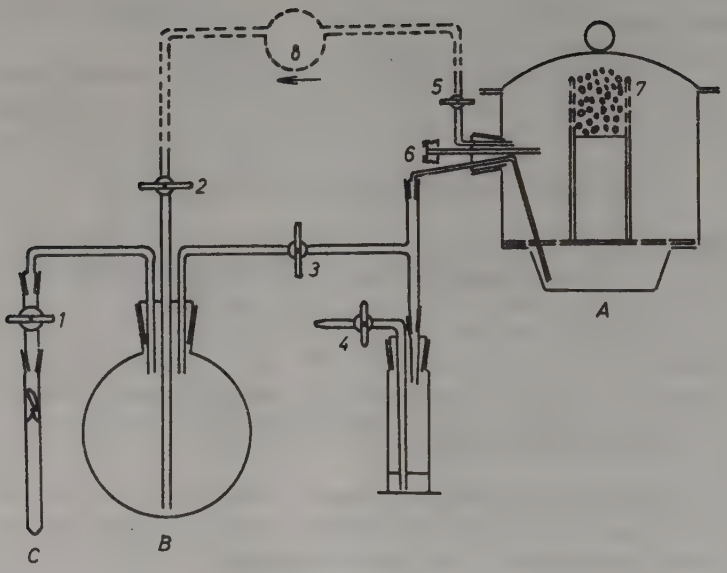
Zur Exposition von Ratten gegenüber radioaktiv markiertem Vinylbromid wurden die von LAIB und BOLT (58) und BOLT (13) beschriebenen Ganzglassysteme verwendet.

Zur Exposition mit varrierenden Konzentrationen an nicht radioaktivem Vinylbromid wurde in einem offenen System mit Halothanverdampfer gearbeitet.

3.2.1. Exposition gegen ^{14}C-Vinylbromid (Abb. 3)

Im Expositionsgefäß (A), ausgestattet mit Septum (6) zur Probenentnahme, Anschluß an O_2-Vorrat im Spirometer (4), Anschluß an Umwälzpumpe (8) und CO_2-Absorbens (7), konnten 4 Ratten exponiert werden.

Dazu wurden der Vorratsbehälter (B) und der Gasraum über der Brechsiegelampulle (C) evakuiert, die Brechsiegelampulle geöffnet und radioaktives ^{14}C-VBr über den Hahn (1) in den Vorratsbehälter (B) dosiert. Nach Druckausgleich mit Raumluft über (2) wurde die Exposition durch Luftumwälzung (8) gestartet und die Abnahme an VBr durch Metabolisierung radiometrisch verfolgt.



A) Expositionsgefäß (10,3 l)

B) Hauptbehälter (250 ml)

C) Brechsiegelampulle

1-5) Hochvakuumhähne

2) Hochvakuumpumpe bzw. Schlauchpumpe (Eingang)

4) Spirometer (O_2 -Einlaß)

6) Septum

7) CO_2 - Absorbens

8) Schlauchpumpe

Abb. 3: Expositionssystem für die Exposition gegen ^{14}C-Vinylbromid

3.2.2. Exposition gegen Vinylbromid

Zur Langzeitexposition mit nicht markiertem VBr wurde flüssiges VBr im Halothanverdampfer bei 258 K (-15°C) gehalten, mit Luft aus einer Kompressoranlage verdampft und der VBr-haltige Luftstrom durch das mit Ratten besetzte Expositionsgefäß (A) (ohne CO_2-Absorbens) von 3.2.1. geleitet. Die VBr-Konzentrationen dieses offenen Systems wurden gaschromatographisch verfolgt.

3.3. Alkylierung von Proteinen und Nukleinsäuren in vitro

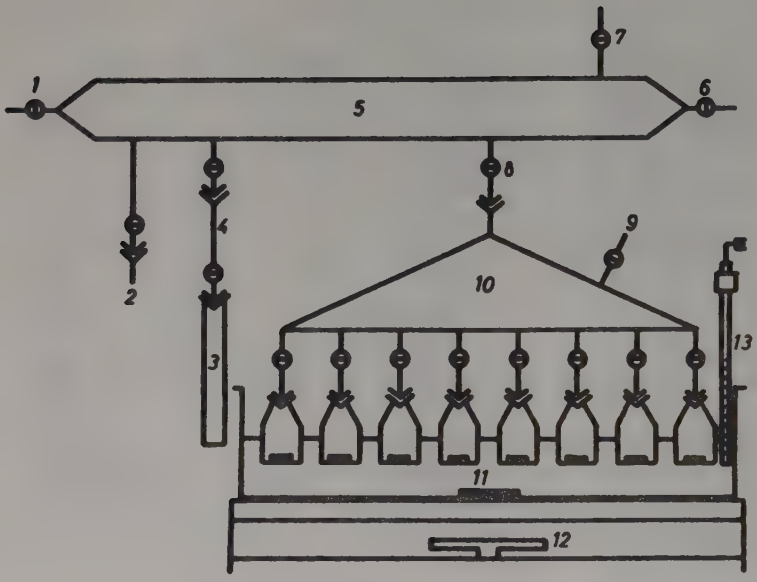
Zum Studium kovalenter Bindung reaktiver Metabolite von VBr an Proteine und Nukleinsäuren wurde die Ganzglasapparatur von KAPPUS et al. (49) in der beschriebenen sowie einer modifizierten Form verwendet.

3.3.1. Alkylierung von Nukleinsäuren in vitro (Abb. 4a)

In der Apparatur nach (49) wurde in Brechsiegelampullen (3) geliefertes, gasförmiges 1,2-^{14}C-Vinylbromid über das evakuierte Verbindungsstück (4) in den Hauptbehälter (5) dosiert. Die eingesetzte Menge an ^{14}C-VBr, gemessen mit Quecksilbermanometer (2), wurde über den Hahn (6) mit Raumluft bis zum Druckausgleich verdünnt. Der Partialdruck des ^{14}C-VBr betrug bei allen Experimenten zumindest das fünffache des Sättigungsdrucks von 13,3 Pa (0,1 Torr) (BOLT et al. (10)).

Die mit Nukleinsäuren und metabolisierendem System (siehe 3.4.2.) beschickten Inkubationsgefäßt, an die Apparatur angeschlossen und mit Eis gekühlt, wurden über (9) zusammen mit dem Glasteil (10) ("Spinne") evakuiert.

Die mikrosomale Metabolisierung von ^{14}C-VBr wurde durch



1) Hochvakuumpumpe
2) Quecksilbermanometer
3) Brechsiegelampulle
4) Verbindungsstück
5) Hauptbehälter
6) Lufteinlass
7) Hochvakuumpumpe
8) ^{14}C-VBr Einlass
9) Hochvakuumpumpe
10) Spinne
11) Wasserbad
12) Magnetrührer
13) Kontaktthermometer

Abb. 4a: Inkubationssystem nach (49) zur Alkylierung von Nukleinsäuren

Öffnen des Hahns (8) gestartet, gleichzeitig wurde das Eisbad gegen ein bei 310 K (37°C) ghermostatisiertes Wasserbad getauscht, über (9) bis zum Druckausgleich Raumluft in das System eingelassen und die Inkubationsansätze gerührt (12).

3.3.2. Proteinalkylierung in Hepatocyten und Sinusoidalzellen

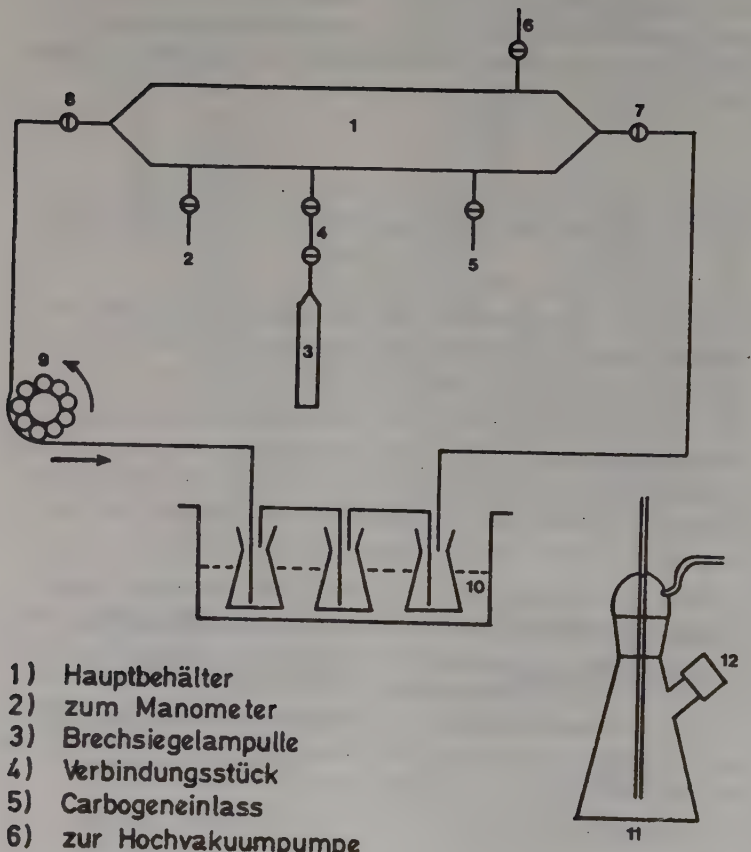
Hepatocyten in Suspension werden durch Rühren stark beansprucht. Deshalb wurde die in 3.3.1. beschriebene Apparatur stark modifiziert (Abb. 4b).

In die mit Carbogen gespülte, evakuierte Apparatur wurde bei geschlossenen Hähnen (7) und (8), wie beschrieben, radioaktiv markiertes, halogeniertes Äthylen über das Verbindungsstück (4) in den Hauptbehälter (1) dosiert und über (5) bis zum Druckausgleich mit Carbogen verdünnt.

In drei Inkubationsgefäßt (je 25 ml) mit Gaseinleitungssystem (11) und Septum zur Probenentnahme (12) wurden je 5 ml Zellsuspension sowie 5 ml Medium als Kontrolle pipettiert und die Metabolisierung durch Öffnen der Hähne (7), (8) und Gasumwälzung mit der Schlauchpumpe (9) gestartet und die Inkubationsgefäße im Wasserbad bei 310 K (37°C) mit ca. 50 Bewegungen/min geschüttelt.

3.4. Metabolisierung und Proteinbindung von ^{14}C-Vinylbromid und ^{14}C-Vinylchlorid durch Hepatocyten und Sinusoidalzellen

Zur Entscheidung der Frage, ob sowohl Hepatocyten als auch Sinusoidalzellen halogenierte Äthylene zu metabolisieren vermögen, wurden die isolierten Zellsorten gleichzeitig mit den entsprechenden gasförmigen Stoffen inkubiert und die Proteinbindung radioaktiver Metabolite gemessen.



1) Hauptbehälter
2) zum Manometer
3) Brechsiegelampulle
4) Verbindungsstück
5) Carbogeneinlass
6) zur Hochvakuumpumpe
7/8) Hochvakuumhähne
9) Umwälzpumpe
10) Inkubationsgefäße; Wasserbad mit Schütteleinrichtung
11) Inkubationsgefäß mit Gaseinleitung
12) Septum zur Probenentnahme

Abb. 4b: Modifiziertes Inkubationssystem nach (49)

3.4.1. Simultanisolierung von Hepatocyten und Sinusoidalzellen

Hepatocyten und Sinusoidalzellen wurden nach der leicht abgeänderten Methode von KREUSCH et al. (55) gleichzeitig aus Rattenlebern isoliert.

Sämtliche Glaswaren, mit denen Zellen in Berührung kamen, waren mit Siliclad^{R} behandelt.

3.4.1.1. Benötigte Medien

1 Ca^{2+}-freier Krebs-Henseleit-Puffer (54), pH 7,4:

118,5 mmol NaCl l^{-1}
4,75 mmol KCl l^{-1}
1,19 mmol KH_2PO_4 l^{-1}
1,19 mmol $MgSO_4$ l^{-1}

2 Medium I, pH 7,4:

Krebs-Henseleitpuffer, 5,5 mmolar an Glukose und 0,5 mmolar an EGTA

3 Medium II, pH 7,4:

EGTA-freies Medium I

4 Medium III (Perfusionsmedium), pH 7,4:

Medium II, ergänzt durch 25,5 g BSA l^{-1} und 770 mg Aminosäuremischung sämtlicher Aminosäuren l^{-1} nach (96)

5 Medium IV (Vollmedium), pH 7,4:

wie Medium III, jedoch 2,54 mmolar an $CaCl_2$

3.4.1.2. Isolierung

Weibliche Wistarratten, 180 g schwer, wurden mit 54,5 mg Natriumpentobarbital pro kg Körpergewicht, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, anästhesiert.

Die Lebern wurden in situ bei Raumtemperatur mit 250 ml des Ca^{2+}-freien (SEGLEN (97), HÖKE et al. (41)) Mediums I über die Pfortader perfundiert und anschließend mit 75 ml Medium II EGTA-frei gespült.

Danach wurden die Lebern in ein rezirkulierendes Perfusionssystem überführt und bei 310 K (37°C) unter Carbogenbegasung (95 % O_2, 5 % CO_2) mit 65 ml Medium III perfundiert. Nach 5 min wurden Ca^{2+} (Endkonzentration 3 mmolar) und Collagenase (Endkonzentration 0,5 mg ml^{-1}) zugesetzt und die Perfusion 35 min fortgesetzt.

Die leicht zerfließlichen Lebern wurden in 40 ml eiskaltem Medium IV mechanisch suspendiert und unter Carbogenbegasung in einem 250 ml Rundkolben 4 min am Rotationsverdampfer bei höchster Drehzahl rotiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz mit 79 µm Maschenweite filtriert, mit Medium IV auf 80 ml aufgefüllt und 3 min bei 37 g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die sedimentierten Hepatocyten wurden 2 mal mit je 40 ml Medium gewaschen, jeweils bei 14 g zentrifugiert und mit 10 ml Medium aufgenommen. Bis zur Weiterverwendung wurde die Zellsuspension unter Carbogen in Eis aufbewahrt.

Sinusoidalzellen wurden aus dem abdekantierten Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes isoliert. Dazu wurde der Überstand in 3 mal 25 ml Portionen aufgeteilt, jeder Teil mit 50 mg Pronase versetzt und unter Carbogenbegasung 50 min bei 310 K (37°C) im Wasserbad mit ca. 90 Schüttelbewegungen min^{-1} inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurden die vereinigten Ansätze 2 min bei 350 g und Raumtemperatur zentrifugiert, die sedimentierten Sinusoidalzellen 2 mal mit je 20 ml Medium IV gewaschen, jeweils wie zuvor abzentrifugiert und zum Schluß mit 5,5 ml Medium IV aufgenommen.

3.4.2. Viabilitätsbeurteilung

Die Anzahl der Zellen in den Suspensionen, sowie die Menge trypanblau-färbbarer Zellen wurden in einer FUCHS-ROSENTHAL-Zählkammer vor und nach Inkubation mit ^{14}C-VBr bzw. ^{14}C-VC bestimmt. Die Endkonzentration an Trypanblau war 0,2 % bei der Auszählung der Hepatocyten bzw. 0,4 % bei der Bestimmung der Sinusoidalzellen.

Als weiteres Kriterium wurden die LDH-Aktivitäten (7) des Homogenats und des Mediums vor und nach der Inkubation bestimmt.

Zur Bestimmung der LDH-Aktivität des Homogenats wurde ein Aliquot Zellsuspension bei 193 K (-80°C) eingefroren, nach dem Auftauen homogenisiert, abzentrifugiert und die LDH-Aktivität im Überstand bestimmt. Die LDH-Aktivität im Medium, bestimmt im Überstand eines zentrifugierten Aliquots Suspension, wurde in Prozent der Aktivität des Homogenats angegeben.

3.4.3. Inkubation mit ^{14}C-Vinylbromid und ^{14}C-Vinylchlorid

In die Inkubationsgefäße der beschriebenen Apparatur (3.3.2.) wurden pipettiert: 5 ml Medium IV als Kontrolle, 5 ml Hepatocytensuspension mit $(2,2 \pm 1,2) \times 10^6$ Zellen ml^{-1} und 5 ml Sinusoidalzellsuspension mit $(6,5 \pm 2,4) \times 10^6$ Zellen ml^{-1}.

3.4.4. Bestimmung der kovalent gebundenen Metabolite

3.4.4.1. Proteinextraktion und Radioaktivitätsmessung

Irreversibel an Protein gebundene Radioaktivität wurde mit der geänderten Methode nach KAPPUS et al. (48) und KAPPUS und REMMER (50) bestimmt.

Alle 5 min wurden den Inkubationen 0,1 ml mit Spritzen durch das Septum entnommen und das Protein mit 1 ml 70 % Äthanol über Nacht bei 277 K ($4^{\circ}C$) präzipitiert. Die Niederschläge wurden 2 mal mit je 0,5 ml 70 % Äthanol, 1 mal 30 min mit 0,5 ml 70 % Äthanol bei 369 K ($96^{\circ}C$) und 1 mal mit 0,5 ml 70 % Äthanol extrahiert. Bei jedem Extraktionsschritt wurden die Niederschläge mit Ultraschall bis zur Homogenität suspendiert und anschließend abzentrifugiert. 0,2 ml der jeweiligen Überstände wurden auf Radioaktivität geprüft. Der Überstand des letzten Extraktionsschritts zeigte keine Radioaktivität mehr.

Das extrahierte Protein wurde mit 0,2 ml H_2O und 0,2 ml Hyamin^{R} versetzt und über Nacht bei 329 K ($56^{\circ}C$) gelöst. Nach Zugabe von 0,2 ml Benzoylperoxydlösung (12,5 g Benzoylperoxid (20 % H_2O) + 12,5 g $CaCl_2$ + 100 ml Toluol) zur Chemolumineszenzlöschung und 10 ml Bray'schem Szintillator wurde die Radioaktivität gemessen.

3.4.4.2. Auswertung der Radioaktivitätsmessungen

Die mit internem Standard bestimmte Zählausbeute betrug 90 %. Damit wurden die Zpm der um die Kontrollwerte (gebundene Radioaktivität im zellfreien Medium) korrigierten Meßwerte ermittelt und mit der spezifischen Radioaktivität (396 GBq mol^{-1}) von ^{14}C-VBr und ^{14}C-VC auf pmol gebundenes halogeniertes Äthylen umgerechnet. Bezogen wird diese gebundene Radioaktivität auf 10^6 Zellen ml^{-1} Inkubat. Die

Zellzahl wurde als Mittelwert der durch Trypanblau nicht anfärbbaren Zellen vor und nach der Inkubation ermittelt.

3.5. Alkylierung von Nukleinsäuren in vitro

Zur Klärung der Frage, ob die Metabolisierung von VBr zu denselben Nukleosidderivaten führt (1,N^6-Äthenoadenosin und 3,N^4-Ethenocytidin), wie sie nach VC-Exposition nachgewiesen werden konnten (58,59), wurden künstliche "Nukleinsäuren" wie Poly(A) und Poly(C) sowie RNS und DNS mit Rattenlebermikrosomen, NADPH-regenerierendem System und ^{14}C-VBr inkubiert und die Nukleoside analysiert.

3.5.1. Präparation von Rattenlebermikrosomen

Die Präparation folgte der Methode von REMMER et al. (90). 180 - 200 g schwere männliche Wistar-Ratten wurden dekapitiert und ausgeblutet, die Lebern entnommen, gewogen, im 6,5 fachen Volumen eiskalter 250 mmolarer Saccharoselösung mit der Schere zerkleinert und im Homogenisator nach Potter-Elvejhem homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 10 000 g zentrifugiert und die Mikrosomen aus dem Überstand 45 min bei 105 000 g in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert.

Das Mikrosomenpellet wurde mit KCl-Tris-Puffer (11,5 g KCl l^{-1} und 250 mmol Tris-HCl l^{-1} im Verhältnis 4:1) pH 7,4, homogenisiert und erneut 45 min bei 105 000 g zentrifugiert. Die gewaschenen Mikrosomen wurden mit diesem Puffer aufgenommen und nach Proteinbestimmung mit der Methode nach LOWRY et al. (66) unter Verwendung einer mit BSA erstellten Eichkurve, auf eine Konzentration von 7 mg Protein ml^{-1} eingestellt.

3.5.2. Inkubation mit ^{14}C-Vinylbromid

In der beschriebenen Apparatur (3.3.1.) konnten gleichzeitig 8 Ansätze inkubiert werden. Die Inkubationsansätze hatten ein Volumen von 1 ml und hatten folgende Zusammensetzung: 5 mmol $MgCl_2$ l^{-1}, 8 mmol DL-Isozitronensäure l^{-1}, 1 mmol $NADP^+$ l^{-1}, 50 µg Isozitratdehydrogenase ml^{-1}, 0 mg - 8 mg Nukleinsäure ml^{-1} und 1,8 mg - 2,5 mg mikrosomales Protein ml^{-1} in 250 mmolarem Tris-HCl-Puffer, pH 7,5. Die Inkubationsdauer war 30 min - 45 min.

3.5.3. Reisolierung der alkylierten Nukleinsäuren

Nach beendeter Inkubation wurden die Inkubationsgefäße im Eisbad auf 273 K (0°C) gekühlt, die Mikrosomen aus den einzelnen Ansätzen durch Ultrazentrifugation (60 min bei 100 000 g) abgetrennt und die eingesetzten Nukleinsäuren aus den Überständen reisoliert.

Zur Entfernung aller wasserlöslichen Metabolite von ^{14}C-VBr wurden die Überstände gegen 200 mmolaren Ammoniumacetatpuffer, pH 6,8, solange bei 277 K (4°C) dialysiert, bis im Dialysepuffer keine Radioaktivität mehr nachweisbar war. Das dialysierte Material wurde dann lyophilisiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 253 K (-20°C) aufbewahrt.

3.6. Alkylierung von Nukleinsäuren in vivo

Wegen der geringen Alkylierungsrate durch Metabolite von VBr mußten für die Experimente in vivo hohe Radioaktivitätsmengen eingesetzt werden.

Im beschriebenen Expositionssystem (3.2.1.) wurden jeweils 4 Tiere einer Radioaktivitätsmenge von 74 MBq ausgesetzt. Die Atmosphäre des Expositionssystems wurde während der er-

sten 60 min mit einer Schlauchpumpe (8) zwischen Expositionsgefäß (A) und Vorratsbehälter (B) umgewälzt. Während der gesamten Versuchsdauer (8 h) wurde der Sauerstoffverbrauch am Spirometer aufgezeichnet und die Metabolisierung von ^{14}C-VBr radiometrisch verfolgt.

Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Bindung von ^{14}C-VBr Metaboliten und ihrer Inkorporation in die Nukleinsäuren der Leber wurden von 2 mal 4 Tieren eines unmittelbar nach Expositionsende (0 h Wert), die anderen 12, 24, 36, 48, 60, 72 und 96 Stunden nach Exposition dekapitiert und ausgeblutet. Die Lebern wurden entnommen, halbiert, sofort bei 193 K (-80^{o}C) tiefgefroren und bis zur Isolierung von RNS bzw. DNS bei dieser Temperatur gelagert.

3.6.1. Isolierung der Nukleinsäuren

Aus den Lebern der exponierten Tiere wurden sowohl RNA als auch DNS isoliert und deren Basenzusammensetzung analysiert.

3.6.1.1. Benötigte Lösungen

1 Puffer A, pH 7,6: 50 mmol Tris l^{-1}
25 mmol KCl l^{-1}
5 mmol $MgCl_2$ l^{-1}
250 mmol Saccharose l^{-1}

2 Puffer B (Phosphatpuffer), pH 6,8
15,5 mmol KH_2PO_4 l^{-1}
14,5 mmol Na_2HPO_4 l^{-1}
140,0 mmol NaCl l^{-1}

3 Heparin-natrium-Lösung (HNL):
10 mg Heparin-natrium ml^{-1}

3.6.1.2. Isolierung der Gesamt-RNS

Die Isolierung folgte den geänderten Methoden von GEORGIEV und MANTIEVA (32) und SHERRER und DARNELL (99), wie von BOLT und REMMER (17) beschrieben.

Die gewogenen Leberhälften wurden in 10 ml Puffer B + 100 µl Heparin-natrium-Lösung (HNL) pro g Leber mit der Schere zerkleinert. Anschließend wurde im Homogenisator nach Potter-Elvejhem mit 500 Upm und 10 Auf- und Abbewegungen homogenisiert, das Homogenat mit demselben Volumen puffergesättigtem Phenol versetzt und 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde 15 min in der Kühlzentrifuge bei 275 K (2°C) im Ausschwingrotor Sorvall HB4 mit 23 000 g zentrifugiert, die wäßrige Oberphase abgehebert (= $Ü_1$) und in Eis aufbewahrt.

Die Unterphase wurde mit demselben Volumen Puffer B und 0,5 ml SDS-Lösung (100 g SDS l^{-1}) pro 10 ml Puffer B versetzt, 15 min bei 338 K (65°C) geschüttelt und 15 min bei 10 000 g zentrifugiert.

Die abgeheberte Oberphase (= $Ü_2$) wurde mit $Ü_1$ vereinigt und mit einer Mischung aus puffergesättigtem Phenol:Chloroform: Isoamylalkohol 50:50:1 so oft extrahiert, bis die Zwischenphase klar war (etwa 5-6 mal). Die extrahierte wäßrige Phase wurde anschließend 5 mal mit demselben Volumen Äther ausgeschüttelt, mit dem doppelten Volumen Äthanol versetzt und die Präzipitation der RNS über Nacht bei 253 K (-20°C) vervollständigt.

Die gefällte RNS wurde mit 23 000 g abzentrifugiert, lyophilisiert und bis zur Basenanalyse bei 253 K aufbewahrt.

3.6.1.3. Isolierung der DNS

Zur Isolierung wurde die Methode von LERMAN et al. (65) in leicht veränderter Form angewendet.

Die gewogenen Leberhälften wurden in 4 ml Puffer A g^{-1} Leber und 0,1 ml HNL pro 10 ml Puffer A mit der Schere zerkleinert und 10 mal mit 1000 Upm im Potter-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde 6 min bei 800 g im Ausschwingrotor zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und verworfen und das Pellet mit 10 ml Triton X-100 Lösung (10 g Triton X-100 l^{-1}) pro 3 g Lebereinwaage und HNL wie zuvor 5 mal mit 500 UPm homogenisiert und wie vorher abzentrifugiert.

Das "rohe" Kernpellet wurde mit 10 ml Puffer A pro 3 g Leber und 0,1 ml HNL pro 10 ml Puffer A wie zuvor homogenisiert und zentrifugiert.

Das "gewaschene" Kernpellet wurde mit 5 ml SDS (20 g SDS l^{-1}) pro 3 g Lebereinwaage und 50 µl HNL je 5 ml SDS-Lösung 25 s mit dem Ultraturrax homogenisiert und anschließend bei 313 K (40°C) 60 min inkubiert.

Die Inkubate wurden dann pro 3 g Lebereinwaage mit 10 ml Phosphatpuffer und 50 µl HNL versetzt und mit 15 ml eines Gemisches aus puffergesättigtem Phenol:Chloroform:Isopropanol 50:50:1 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 15 min mit 12 000 Upm im Ausschwingrotor zentrifugiert. Die DNS-haltige, wäßrige Oberphase wurde mit Glasspritzen abgehebert und 3 mal mit demselben Volumen ausgeäthert und danach mit dem doppelten Volumen Äthanol versetzt.

Die Präzipitation der DNS wurde über Nacht bei 253 K (-20°C) vervollständigt, die Niederschläge mit 12 000 Upm abzentrifugiert, lyophilisiert und bei 253 K (-20°C) aufbewahrt.

3.7. Analyse alkylierter Nukleinsäuren

Die alkylierten Nukleinsäuren der Experimente in vitro und in vivo wurden nach zweistufiger, enzymatischer Hydrolyse als Nukleoside mit dem stark sauren Kationenaustauscher Aminex A-6 säulenchromatographisch analysiert.

3.7.1. Enzymatische Nukleinsäurehydrolyse

Wegen Instabilität der Äthenoderivate von Nukleobasen bei saurer und alkalischer Hydrolyse (58) wurden Ribonukleinsäuren in der schon beschriebenen Weise (58,59) und Desoxyribonukleinsäuren in einer modifizierten Form enzymatisch zu Nukleosiden hydrolysiert.

Im ersten Schritt wurden die Nukleinsäuren durch Endonukleasen zu Oligonukleotiden abgebaut, die im zweiten Schritt durch Exonuklease und Phosphatase vollständig zu Nukleosiden hydrolysiert wurden.

3.7.1.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung des Gehalts an Nukleinsäuren wäßriger Lösungen wurden mit den artifiziellen Nukleinsäuren Poly(A) und Poly(C) sowie mit RNS aus Kalbsleber und DNS aus Kalbsthymus Eichgeraden aufgenommen und die jeweilige aktuelle Konzentration danach ermittelt.

3.7.1.2. Hydrolyse von RNS

Die lyophilisierten Proben von 3.4.3. und 3.5.1.2. wurden mit 0,1 molarem Ammoniumacetatpuffer, pH 6,6 gelöst. 0,2 ml bis 0,4 ml dieser Nukleinsäurelösungen mit 1,5 mg bis 2,5 mg RNS wurden mit 0,07 ml Ribonuklease T_1-Suspension 5 h bei 310 K (37°C) inkubiert. Dann wurden je 0,07 ml Suspension von Phosphodiesterase und saurer Phosphatase zugegeben und der Ansatz über Nacht (15 h) bei 310 K (37°C) inkubiert.

Nach beendeter Hydrolyse wurden dem Hydrolysat je 0,05 ml 10^{-2} molare Äthenoadenosin- und 10^{-2} molare Äthenocytidinlösung zugesetzt.

Die reisolierten künstlichen Nukleinsäuren Poly(A) und Poly(C) wurden entsprechend behandelt.

3.7.1.3. Hydrolyse von DNS

Zur Hydrolyse von DNS wurde das obige Verfahren nur geringfügig abgeändert. 5 mg Desoxyribonuklease I je Ansatz (1,5 mg bis 2,5 mg DNS in 0,2 ml - 0,4 ml) ersetzten die Ribonuklease als Endonuklease. Nach 5-stündiger Inkubation wurden Phosphodiesterase und saure Phosphatase wie oben zugesetzt und über Nacht inkubiert. Neben je 40 µl Äthenoadenosin (10^{-2} molar) und Äthenocytidin (10^{-2} molar) wurden 20 µl Äthenodesoxyadenosin und 10 µl Äthenodesoxycytidin dem Hydrolysat zugesetzt.

3.7.2. Analyse der Nukleinsäurehydrolysate

Die von UZIEL et al. (103) sowie GASSEN und LEIFER (30) ausgearbeiteten Methoden zur Nukleinsäureanalyse auf der Stufe der Nukleoside wurden von LAIB und BOLT (59) modifiziert, um vollständige Trennung der vier Hauptnukleoside von RNS und der beiden Äthenoderivate zu erreichen.

3.7.2.1. Analyse der RNS-Hydrolysate

Das Chromatographiesystem bestand aus einer bei 323 K (50°C) thermostatisierten Austauschersäule mit 10 mm Innendurchmesser und 300 mm hoher Austauscherfüllung (Aminex A-6), äquilibriert mit entgastem Elutionspuffer I, pH 4,2, 0,32 molar an Ammoniumformiat und 0,032 an Ameisensäure. Der Elutionspuffer wurde diskontinuierlich durch eine Stempelpumpe mit einer Geschwindigkeit von 12,4 ml h^{-1} gepumpt und zur Messung der Transmission durch zwei hintereinandergeschaltete UV-Einheiten für 254 nm und 280 nm geleitet.

0,5 ml Hydrolysat wurden über eine Auftragsschleife aufgegeben und mit Elutionspuffer I bis zum Erscheinen von Äthenoadenosin (160 ml) eluiert. Danach wurden mit Elutionspuffer II, pH 7,0 (0,4 molar an Ammoniumformiat und 0,04 molar an Ameisensäure) alle restlichen, zurückgehaltenen Nukleobasen beschleunigt eluiert (Abb. 5).

Das Eluat wurde in Fraktionen mit 3,1 ml aufgefangen und jede Fraktion quantitativ in 10 ml Aquasol^{R} überführt und die Radioaktivität gemessen.

Anhand der Übereinstimmung von Peaks im Radioaktivitätsprofil und UV-Diagramm konnten die Alkylierungsprodukte identifiziert werden.

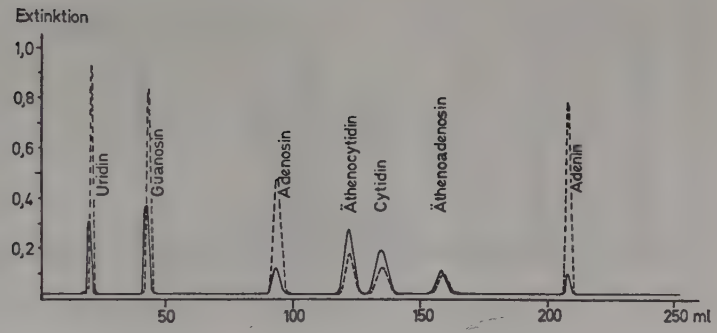


Abb. 5: Ionenaustauschchromatographie eines Nukleosidgemisches an Aminex A-6 zur Kontrolle von Retentionsvolumen und Extinktion (254 nm ----- und 280 nm ———). Aufgetragen wurden die bei Hydrolyse von RNS entstehenden Haupt-Ribonukleoside und das aus Adenosin entstehende Adenin sowie die Äthenoderivate Äthenoadenosin und Äthenocytidin. (Unter Hydrolysebedingungen wird Adenosin fast quantitativ zu Adenin hydrolysiert, während Äthenoadenosin stabil ist). Chromatographiebed.: siehe Text.

3.7.2.2. Analyse der DNS-Hydrolysate

Da bei Isolierung von Kern-DNS auch hnRNS mit isoliert wird, treten somit bei der Hydrolyse neben den Desoxyribonukleosiden und ihren Alkylierungsprodukten auch sämtliche Ribonukleoside mit Alkylierungsderivaten auf. Das Chromatographiesystem mußte deshalb so modifiziert werden, daß alle möglichen Nukleoside getrennt werden konnten (Abb. 6).

Die Austauschersäule wurde auf 370 mm verlängert und bei 318 K (45^{o}C) thermostatisiert. Eluiert wurde mit dem geänderten Elutionspuffer III (0,28 molar an Ammoniumformiat und 0,028 molar an Ameisensäure) pH 4,35. Auch in diesem System wurden die restlichen retardierten Hydrolyseprodukte

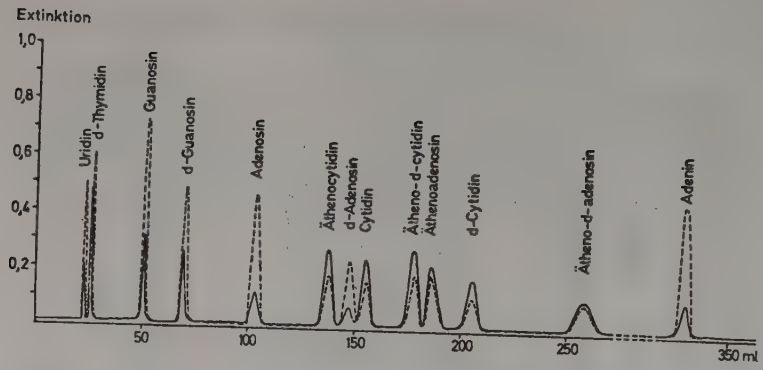


Abb. 6: Testanalyse eines Nukleosidgemisches an Aminex A-6, das sämtliche Ribo- und Desoxyribonukleoside, die Äthenoderivate von Adenosin und Cytidin und deren Desoxy-Analoga sowie Adenin enthielt, zur Bestimmung der Retentionsvolumina und der Extinktionen (254 nm ----- und 280 nm ———). Chromatographiebed.: siehe Text.

mit Elutionspuffer II beschleunigt eluiert.

Die Fraktionsvolumina betrugen 3,1 ml. Sie wurden wie oben beschrieben quantitativ in je 10 ml Aquasol^{R} überführt und gemessen. Die Zuordnung der Nukleoside erfolgte nach Retentionsvolumen und Extinktionsverhalten. Die Alkylierungsprodukte konnten durch die Koinzidenz von Radioaktivitäts- und Extinktionspeaks identifiziert werden.

3.8. Messenger-RNS und Proteinbiosynthese in vitro

mRNS aus Rattenlebern behandelter und unbehandelter Tiere wurde durch Polysomenisolierung, anschließender Phenolextraktion und Chromatographie an Oligo(dT)-Cellulose als Poly(A)-haltige RNS isoliert und in einem Weizenkeimsystem auf mRNS-Aktivität getestet.

3.8.1. Benötigte Pufferlösungen

Alle Massen- und Gewichtsangaben beziehen sich auf 1 Liter Lösung.

Puffer 1, pH 7,5:	140 mmol	Sucrose
	25 mmol	Tris-HCl
	25 mmol	NaCl
	25 mmol	$MgCl_2$
	2 g	Heparin-natrium
Puffer 2, pH 5,0:	50 mmol	Natriumacetat
	10 g	Natriumdodecylsulfat
Puffer 3, pH 7,5:	10 mmol	Tris-HCl
	500 mmol	NaCl
Puffer 4, pH 7,5:	1000 mmol	Sucrose
("Sucrosekissen")	25 mmol	Tris-HCl
	25 mmol	NaCl
	100 mmol	$MgCl_2$
	500 mg	Heparin-natrium
Puffer 5, pH 7,6:	20 mmol	HEPES
	100 mmol	KCl
	2 mmol	$CaCl_2$
	1 mmol	Magnesiumacetat
	6 mmol	Mercaptoäthanol
Puffer 6, pH 7,6:	200 mmol	HEPES
	20 mmol	DTT
Puffer 7, pH 7,6:	20 mmol	HEPES
	125 mmol	KCl
	5 mmol	Magnesiumacetat
	6 mmol	Mercaptoäthanol

Puffer 8:
20 mmol ATP
400 µmol GTP
160 mmol Kreatinphosphat
800 mg Kreatinphosphokinase

Sämtliche Puffer wurden mit eingestelltem pH-Wert autoklaviert und anschließend mit bidestilliertem, sterilem H_2O auf das Endvolumen aufgefüllt.

3.8.2. Isolierung Poly(A)-haltiger RNS

Alle Glaswaren, die für die Isolierung benötigt wurden, waren steril. Zentrifugengläser aus Polypropylen waren mit Wasserstoffperoxid behandelt. Es wurde nur quarz-bidestilliertes, autoklaviertes H_2O verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, in einer Kühlzentrifuge bei 275 K (2°C) ausgeführt.

3.8.2.1. Vorbereitende Schritte

Jeweils drei weibliche Wistar-Ratten, 180 g schwer, wurden 8 h gegenüber 200 ppm bzw. 2000 ppm Vinylbromid exponiert (s. 3.2.1.). Danach wurden die Tiere dekapitiert, die Lebern sehr schnell entnommen, in flüssiger Luft tiefgefroren und bis zur Aufarbeitung bei 193 K (-80°C) gehalten.

3.8.2.2. Polysomenpräparation

Die Präparation folgte in modifizierter Form der von PALMITER (83) angegebenen Methode.

Gesamtpolysomen (freie und gebundene) wurden aus dem 30 000 g Überstand des Leberhomogenats isoliert. Die gewo-

genen Lebern wurden in 6-fachem Volumen eiskalten Puffers 1 mit der Schere zerkleinert und unter Eiskühlung mit 500 Upm und 7 Auf- und Abbewegungen im Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Nach Zugabe von 1/9 Volumen Detergenzlösung (100 g Natriumdesoxycholat l^{-1} und 100 g Triton X-100 l^{-1}) wurde mit drei Auf- und Abbewegungen erneut homogenisiert, die Homogenisate im Festwinkelrotor Sorvall SS 34 mit 30 000 g (= 15 000 Upm) zentrifugiert und die dekantierten Überstände mit einer 1 molaren $MgCl_2$-Lösung auf 100 mmol $MgCl_2$ l^{-1} gebracht. Die Aufarbeitungszeit bis zu diesem Schritt war nie länger als 15 min.

Bis zur vollständigen Präzipitation standen die Suspensionen 60 min in Eis, wurden dann in 20 ml Portionen vorsichtig auf vorgelegte 5 ml Puffer 4 ("Sucrosekissen") überschichtet und im Ausschwingrotor Sorvall HB4 10 min mit 10 000 Upm zentrifugiert. Überstand und Sucrosekissen wurden sorgfältig mit Pasteurpipette und schwachem Wasserstrahlvakuum abgesaugt, das gelblich-weiße Polysomenpellet mit 40 ml Puffer 2 pro 20 g Lebereinwaage aufgenommen und im Wasserbad bei 310 K (37°C) unter leichtem Schütteln gelöst.

3.8.2.3. Isolierung von RNS durch Phenolextraktion (PALMITER (83))

Die gelösten Polysomen wurden mit 40 ml Puffer 2 - gesättigter Phenollösung pro 20 g Lebereinwaage versetzt, 5 min kräftig gerührt und nach Zugabe von 40 ml Chloroform pro 20 g Leber weitere 5 min extrahiert.

Zur schnellen Phasentrennung wurden die Mischungen 2 min mit 4 000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend die untere Phase mit Pasteurpipette und leichtem Wasserstrahlvakuum abgesaugt.

Nach erneuter Chloroformzugabe wurde die obige Prozedur so oft wiederholt, bis die Zwischenphase klar bzw. verschwun-

den war. Danach wurden Unter- und Zwischenphase vorsichtig abgesaugt, die wäßrige Oberphase mit 3 molarer Natriumacetatlösung, pH 6,0, auf 100 mmolar an Natriumacetat gebracht, mit dem doppelten Volumen Äthanol versetzt und die RNS über Nacht bei 253 K (-20°C) gefällt.

3.8.2.4. Chromatographie an Oligo(dT)-Cellulose (nach AVIV und LEDER (2))

Die präzipitierte RNS wurde durch 10-minütige Zentrifugation im Ausschwingrotor bei 10 000 Upm gesammelt und die Pellets, im wesentlichen mRNS und rRNS enthaltend, pro 20 g Lebereinwaage mit 40 ml Puffer 3, ergänzt mit 1 g SDS l^{-1}, unter Rühren gelöst.

Die RNS-Lösung lief langsam (ca. 1 Tropfen s^{-1}) auf eine mit SDS-haltigem Puffer 3 äquilibrierte Oligo(dT)-Cellulose-Säule (Gelbett: 20 mm Ø, 50 mm hoch) auf. Danach wurde mit diesem Puffer nachgewaschen, bis die Extinktion des Eluats auf Werte unter 0,01 abgesunken war. Nach Wechsel auf Puffer 3 ohne SDS wurde die Säule weiter gewaschen, bis wiederum Extinktionswerte kleiner 0,01 erreicht waren.

Danach wurde die Poly(A)-haltige mRNS mit H_2O eluiert und das Eluat bis zu Extinktionswerten unter 0,1 aufgefangen. Mit 3 molarer Natriumacetatlösung, pH 6,0, wurde das gesammelte Eluat auf 100 mmolar Natriumacetat eingestellt, mit dem doppelten Volumen Äthanol versetzt und über Nacht bei 253 K (-20°C) präzipitiert.

Die durch 10-minütige Zentrifugation im Ausschwingrotor bei 10 000 Upm gesammelten mRNS-Niederschläge wurden durch Waschen mit 3 ml 3 molarer Natriumacetatlösung von eventuell noch vorhandenem Heparin, einem potenten Inhibitor der ribosomalen Initiation (82,106), sowie niedermolekularer RNS gereinigt (84); anschließend wurden die Niederschläge mit je 3 ml 70 %, 80 %, 90 % und 100 % Äthanol gewaschen, dazwischen jeweils, wie oben angegeben, zentrifugiert und

über Kieselgel im Exsikkator getrocknet.

Die trockene, Poly(A)-haltige mRNS wurde mit soviel H_2O aufgenommen, daß die optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) zwischen 10 und 50 Einheiten je ml lag und sofort bei 193 K ($-80^{o}C$) eingefroren und gelagert.

3.8.3. Proteinbiosynthese in vitro

3.8.3.1. Präparation des Weizenkeimsystems

Die Isolierung des translationsfähigen Systems erfolgte im wesentlichen nach den von ROBERTS und PATERSON (92) beschriebenen und von ROEWEKAMP et al. (93) modifizierten Methoden.

3.8.3.1.1. Isolierung des Weizenkeimextrakts

Aus Weizenkeimen der Marke "Ährenstolz" wurde nach Homogenisieren und Zentrifugieren ein 30 000 g Überstand (= S-30 Fraktion) gewonnen, der das Translationssystem enthielt.

6 g Weizenkeime wurden in der Reibschale mit 6 g Seesand und 28 ml Puffer 5 unter guter Eiskühlung homogenisiert und danach im Festwinkelrotor mit 30 000 g (= 15 000 Upm) 10 min zentrifugiert. Unter Vermeidung von Kontamination durch Fett oder Pellet wurde der Überstand abgesaugt und entweder bei 193 K ($-80^{o}C$) bis zur Weiterverwendung eingefroren oder sofort vorinkubiert (s. 3.8.3.1.2.).

3.8.3.1.2. Vorinkubation der S-30 Fraktion

Die S-30 Fraktion wurde mit 100 mmolarer Magnesiumacetatlösung 3,5 mmolar gemacht, mit 0,1 Volumen Puffer 6 und 0,05 Volumen Puffer 8 versetzt und 15 min bei 303 K (30°C) inkubiert. Zur Erniedrigung der endogenen Aktivität des Translationssystems durch Entfernen tRNS-gebundener Aminosäuren wurde nach beendeter Inkubation mit 2 molarer Tris-Lösung bis pH 9 alkalisiert (93). Anschließend wurde über eine mit Puffer 7 äquilibrierte Sephadex G-25 Säule (20 mm Ø, 500 mm Höhe) rasch entsalzt, indem 10 - 12 ml S-30 Fraktion aufgetragen und mit Puffer 7 eluiert wurden. Die trüben Peakfraktionen des Eluats wurden vereinigt, auf 200 Einheiten OD_{260} ml^{-1} verdünnt und mittels Spritze in flüssigen Stickstoff eingetropft. Die gefrorenen Kugeln konnten bei 193 K (-80°C) mehr als 6 Monate ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

3.8.3.2. Translationssystem in vitro

Das Proteinsynthese-Testsystem stimmte weitgehend mit dem in der Literatur angegebenen überein (92). Ein Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 50 µl und folgende Zusammensetzung:

11 OD_{260}-Einheiten vorinkubierte S-30 Fraktion
20 mmol HEPES l^{-1}, pH 7,6
2 mmol DTT l^{-1}
70 mmol KCl l^{-1}
1 mmol ATP l^{-1}
20 µmol GTP l^{-1}
2 mmol Magnesiumacetat l^{-1}
8 mmol Kreatinphosphat l^{-1}
40 mg Kreatinphosphokinase l^{-1}
300 µmol Spermidin l^{-1}
50 µmol jede nichtmarkierte Aminosäure l^{-1}
ca. 750 KBq ^{35}S-Methionin

Da die Proteinsynthese in diesem System im Konzentrationsbereich 80 mg mRNS ml^{-1} bis 120 mg mRNS ml^{-1} nicht von der Menge eingesetzter mRNS abhängt (93), wurde den unter Eiskühlung pipettierten Ansätzen 6 µg isolierte, Poly(A)-haltige mRNS zugefügt und die Proteinsynthese durch Einstellen in ein Wasserbad bei 303 K (30°C) gestartet.

3.8.3.3. Bestimmung der Gesamtproteinsynthese
(nach MANS und NOVELLI (72))

Zur Beendigung der Proteinsynthese in vitro nach 40 min wurden 5 µl Aliquots auf Filterpapierscheiben von 23 mm Ø pipettiert, die nach Lufttrocknung 2 mal 15 min mit je 150 ml Lösung aus 50 g Trichloressigsäure l^{-1} und 10 mmol Methionin l^{-1} extrahiert, 15 min in 150 ml dieser Lösung gekocht und noch einmal 15 min mit 150 ml kalter Lösung extrahiert wurden. Danach wurden die Filter je 2 mal mit Äthanol und Äther gewaschen, getrocknet, zu 10 ml Toluolszintillator gegeben und die Radioaktivität gemessen.

3.8.4. Elektrophorese und Fluorographie

Zur Beantwortung der Frage, ob durch Basenalkylierung der mRNS Veränderungen im Bandenmuster der synthetisierten Proteine auftreten, wurden den Inkubationsansätzen Aliquots entnommen, elektrophoretisch aufgetrennt und die Verteilung der Banden fluorographisch untersucht.

3.8.4.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach (56,112)

Die Inkubationsansätze wurden 10 min mit 10 000 Upm bei 275 K (2°C) im Festwinkelrotor Sorvall SS 34 zentrifugiert. 15 µl der Überstände, mit Probenpuffer (1,37 mol Glycerin l^{-1}, 0,71 mol Mercaptoäthanol l^{-1}, 30 g SDS l^{-1}, 625 mmol Tris-HCl l^{-1} und 0,1 g Bromphenolblau l^{-1}), pH 6,8, auf 50 µl aufgefüllt, wurden 3 min bei 373 K (100°C) erhitzt, wie oben zentrifugiert und die für 200 000 Ipm berechnete Menge für die Elektrophorese aufgetragen.

Die Endkonzentrationen der Trenngele waren: 0,375 mol Tris-HCl l^{-1}, pH 8,8; 100 g Acrylamid l^{-1}; 2,66 g N,N'-bis-methylenacrylamid l^{-1} und 1 g SDS l^{-1}. Die Gele wurden chemisch mit 1 g Ammoniumpersulfat l^{-1} und 3,31 mmol TEMED l^{-1} polymerisiert.

Die Sammelgele setzten sich zusammen aus: 0,125 mol Tris-HCl l^{-1}, pH 6,8; 29,9 g Acrylamid l^{-1}; 0,8 g N,N'-bis-methylenacrylamid l^{-1}; 1 g SDS l^{-1}. Sie wurden mit 0,3 g Ammoniumpersulfat und 6,6 mmol TEMED l^{-1} polymerisiert.

Der Elektrodenpuffer enthielt 25 mmol Tris-HCl l^{-1}, pH 8,8; 0,192 mol Glycin l^{-1} und 1 g SDS l^{-1}. Die Elektrophoresen wurden bei konstantem Strom gefahren: 5 min mit 20 mA, dann 180 min - 240 min mit 50 mA.

3.8.4.2. Fluorographie (nach (18,63)

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele entweder angefärbt (30 min in einer Lösung aus 2,5 g Coomassie Blue l^{-1}, 11,21 mol Methanol l^{-1} und 1,61 mol Essigsäure l^{-1}) und über Nacht in einer Lösung aus Eisessig:Methanol:Wasser = 7:40:53 entfärbt oder die Gele wurden ohne Anfärbung in dieser Lösung fixiert (82).

Danach wurden die Gele zur Wasserverdrängung 2 mal 30 min

in je 400 ml DMSO eingelegt und anschließend 180 min mit einer Lösung aus 16 g PPO und 80 g DMSO imprägniert.

Bevor die Gele auf einer evakuierbaren Trockenplatte aus geschäumtem Polyäthylen auf Filterpapier aufliegend und mit Polyäthylenfolie abgedeckt, getrocknet werden konnten, mußte DMSO durch 60-minütiges Einlegen in 400 ml H_2O entfernt werden.

Die getrockneten Gele wurden auf die vorbelichtete Seite (Blitz aus 140 cm Höhe, Kodak Wratten Filter 16) des Roentgenfilms gelegt und beide zwischen Glasplatten fixiert. Der Film wurde bei 193 K ($-80^{\circ}C$) exponiert.

4. ERGEBNISSE

4.1. Alkylierung von Nukleinsäuren durch reaktive Metabolite von ^{14}C-Vinylbromid in vitro und in vivo

Der Metabolismus von Vinylchlorid wird, seit seine Kanzerogenität erkannt ist, intensiv untersucht (3,6,8,9,12,13,14, 34,35,36,37,39,43,48,49,58,59,61,68,73,79,80,81,108,109, 110,111). In Studien mit ^{14}C-Vinylchlorid und unter Anwendung der Kombination Gaschromatographie - Massenspektrometrie wurden als Hauptausscheidungsprodukte im Urin gefunden: Thiodiessigsäure (34,79,80,109,110). N-acetyl-S-(2-hydroxyäthyl)-cystein (109,110), S-carboxycysteinmethylester (79,80) und S-(2-hydroxyäthyl)-Cystein (85). Diese Ergebnisse geben jedoch noch keine Antwort auf die Frage nach den Ursachen der kanzerogenen und mutagenen (5,6,43, 68,73,88) Wirkungen von Vinylchlorid. Auf der Suche nach reaktiven Metaboliten, verantwortlich für die diversen biologischen Wirkungen, zeigten BARBIN et al. (3) erstmals mit Mikrosomen aus Mäuseleber, daß sich aus Vinylchlorid und Vinylbromid metabolisch flüchtige, alkylierende Metabolite bilden. Für VC identifizierten sie Chloräthylenoxid und Chloracetaldehyd als reaktive Metabilite und schlugen für VBr die analogen Bromverbindungen als Intermediärprodukte vor. Inzwischen konnten zwei Alkylierungsprodukte von VC in RNS in vitro und in vivo identifiziert werden: 1,N^6-Äthenoadenosin (3) und 3,N^4-Äthenocytidin (59), deren Synthese durch Reaktion von Adenosin und Cytidin mit Chloracetaldehyd erstmals von KOCHETKOV et al. (53) durchgeführt wurde.

Die zunehmende Verwendung von VBr als Monomer zur Erzeugung schwer entflammbarer Polymerer und Hinweise auf seine Hepatotoxizität (24) und mögliche Kanzerogenität (1), machten Untersuchungen über seine Alkylierungspotenz von Nukleinsäuren notwendig, zumal die Alkylierung von Proteinen durch Vinylbromidmetabolite schon nachgewiesen werden konnte (10).

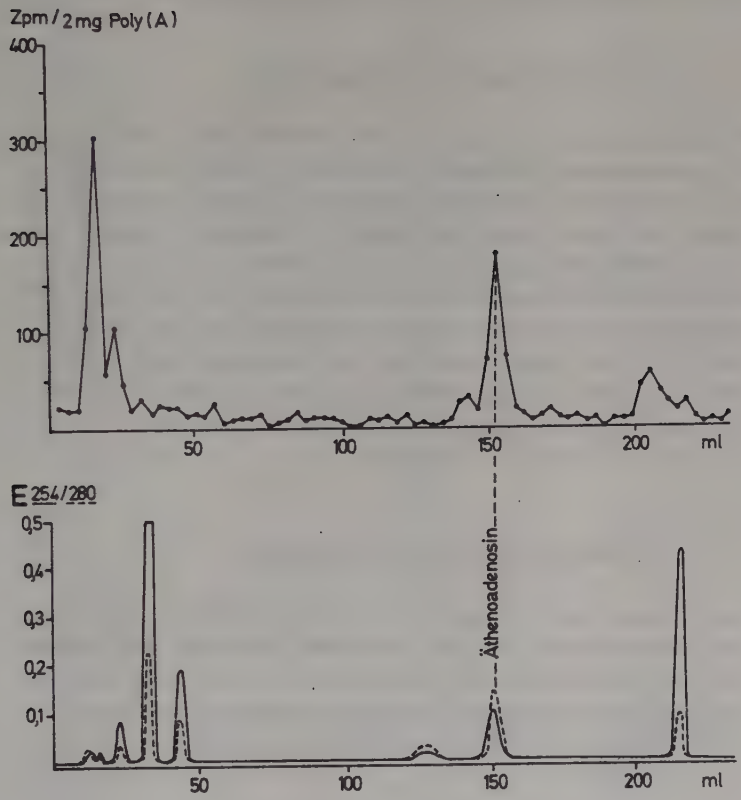


Abb. 7: Ionenaustauschchromatographie (Aminex A-6) hydrolysierter Polyadenylsäure, die mit Mikrosomen aus Rattenleber und ^{14}C-Vinylbromid inkubiert worden war.
Oben: Radioaktivitätsprofil, unten: Extinktion bei 254 nm (——) und 280 nm (----). 1,N^6-Äthenoadenosin wurde dem Hydrolysat als nichtradioaktive "Marker"-Substanz zugesetzt.

4.1.1. Alkylierung artifizieller Nukleinsäuren

4.1.1.1. Alkylierung von Polyadenylsäure

Polyadenylsäure wurde wie im methodischen Teil beschrieben mit Rattenlebermikrosomen, NADPH und ^{14}C-VBr inkubiert. Abb. 7 zeigt das Elutionsdiagramm und das Radioaktivitätsprofil des Hydrolysats von zuvor so inkubierter Polyadenylsäure. Radioaktivitätspeak und Elutionspeak des als optischer Marker zugesetzten Äthenoadenosins stimmen überein. Radioaktivität und Äthenoadenosin wurden bei 152 ml eluiert, das als Hydrolyseprodukt des Adenosins auftretende Adenin bei 217 ml. Die zusätzlich noch auftretenden Peaks der Radioaktivität wurden nicht näher untersucht.

4.1.1.2. Alkylierung von Polycytidylsäure

Abb. 8 zeigt den analogen Versuch mit Polycytidylsäure. Auch hier stimmen die Peaks von Radioaktivität und Extinktion der zugesetzten Markersubstanz Äthenocytidin überein (Elution bei 124 ml). Ein weiterer Radioaktivitätspeak, dicht bei unverändertem Cytidin eluiert, wurde nicht weiter untersucht.

Zu Abb. 8: Ionenaustauschchromatographie (Aminex A-6) hydrolysierter Polycytidylsäure, die mit Mikrosomen aus Rattenleber und ^{14}C-Vinylbromid inkubiert worden war. Oben: Radioaktivitätsprofil, unten: Extinktion bei 254 nm (——) und 280 nm (----). 3,N^4-Äthenocytidin wurde dem Hydrolysat als nichtradioaktive "Marker"-Substanz zugesetzt.

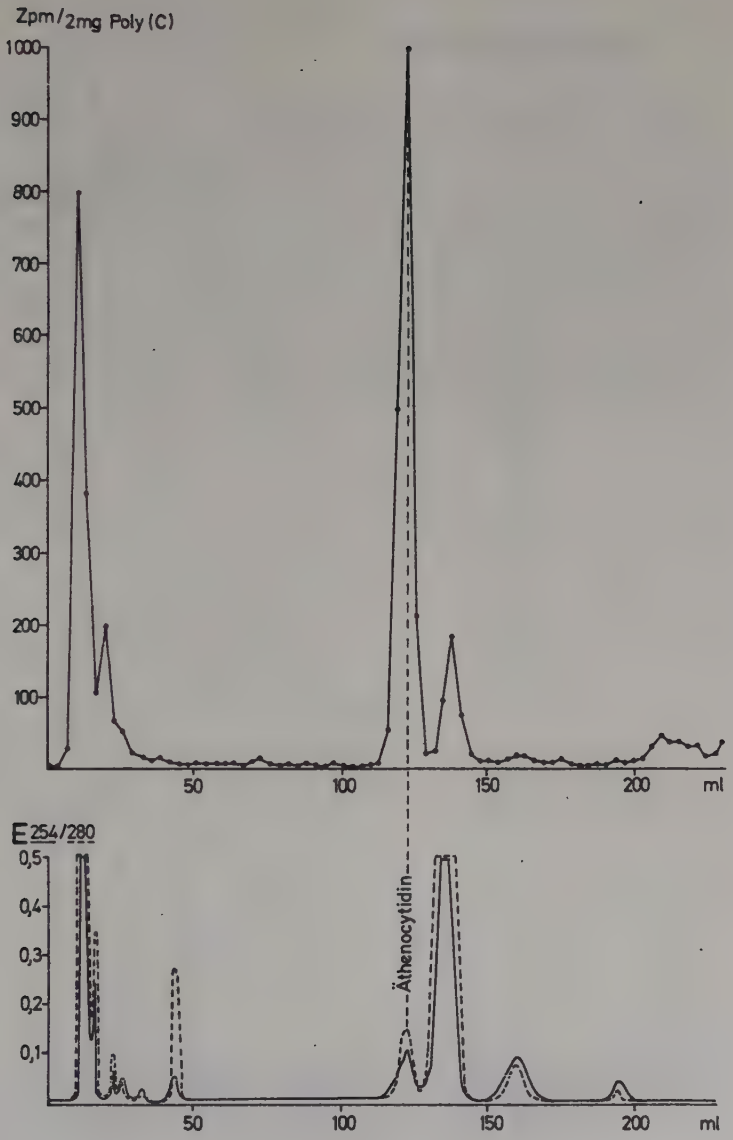

Zpm/2mg Poly (C)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
50
100
150
200
ml
E 254/280
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
Äthenocytidin
50
100
150
200
ml

Abb. 8

4.1.2. Alkylierung von RNS

4.1.2.1. Alkylierung von RNS in vitro

Wird RNS aus Kalbsleber mit ^{14}C-VBr, Mikrosomen und NADPH-regenerierendem System inkubiert, so können dieselben Alkylierungsprodukte nachgewiesen werden, wie sie bei den künstlichen Nukleinsäuren gefunden wurden (Abb. 9). Neben den radioaktiv markierten Äthenoverbindungen von Adenosin und Cytidin wurden weitere, nicht identifizierte Radioaktivitätspeaks bei 133 ml, 198 ml und 211 ml eluiert.

Zu Abb. 9: Ionenaustauschchromatographie (Aminex A-6) hydrolysierter RNS, die mit Mikrosomen aus Rattenleber und ^{14}C-Vinylbromid inkubiert worden war. Oben: Radioaktivitätsprofil, unten: Extinktion bei 254 nm (——) und 280 nm (----). 1,N^6-Äthenoadenosin und 3,N^4-Äthenocytidin wurden als Markersubstanzen zugesetzt und bei 161 ml bzw. 124 ml eluiert.

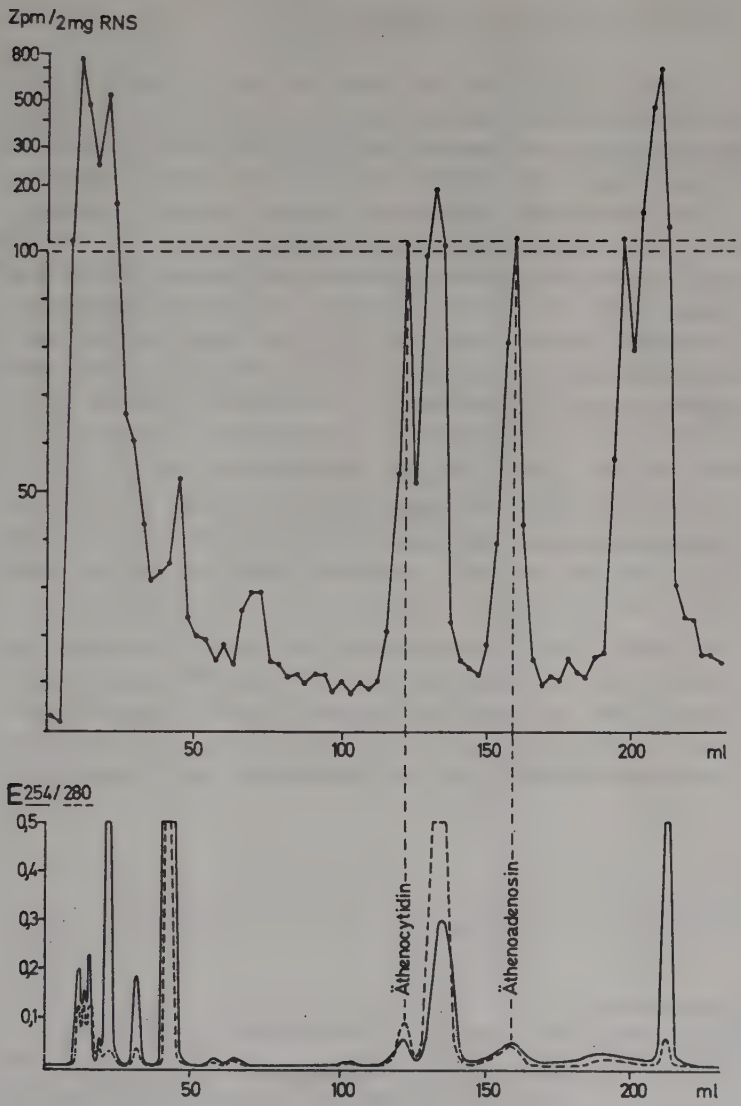

Zpm/2mg RNS
800
500
300
200
100
50
50
100
150
200
ml
E254/280
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
Äthenocytidin
Äthenoadenosin
50
100
150
200
ml

Abb. 9

4.1.2.2. Alkylierung von RNS in vivo

Die Analyse hydrolysierter Leber-RNS aus ^{14}C-VBr exponierten Ratten ergab, daß auch in vivo Äthenoadenosin und Äthenocytidin gebildet werden (Abb. 10), wenn auch in sehr geringer Menge. Große Mengen Radioaktivität wurden dagegen in die natürlichen Nukleoside Cytidin, Adenosin, Guanosin und Uridin inkorporiert. Eine Zusammenstellung der Daten von Hydrolysaten von RNS aus 8 exponierten Tieren, die in den angegebenen Zeitabständen (s. 3.6.) nach Expositionsende untersucht wurden, gibt Tabelle 1. Die Daten zeigen, daß die Inkorporation in die natürlichen Nukleoside einen zweigipfligen Verlauf aufweist, mit Maxima bei 12 h bis 24 h und bei 72 h nach Exposition. Der Inkorporationsverlauf entspricht damit nicht ganz den Verhältnissen bei VC (11).

Die weitaus größte Einbaurate zeigt Guanosin. Die Peakform der eluierten Radioaktivität gibt im Gegensatz zu den Verhältnissen bei DNS keinen Hinweis darauf, ob verschiedene Substanzen zeitgleich eluiert wurden.

Der Verlauf der Zeitabhängigkeit der in RNS gefundenen Mengen an Äthenoadenosin und Äthenocytidin ist nicht so eindeutig (Abb. 11), was möglicherweise damit zusammenhängt, daß die Konzentrationen dieser Nukleoside im Grenzbereich der Nachweisbarkeit bei der angewandten analytischen Methode lagen.

Zu Abb. 10: Chromatographie (Aminex A-6) hydrolysierter Leber-RNS aus Ratten, die gegen ^{14}C-Vinylbromid exponiert worden waren. Oben: Elution der Radioaktivität, unten: Elution UV-absorbierenden Materials. Für die Elutionsvolumina: siehe Abb. 9.

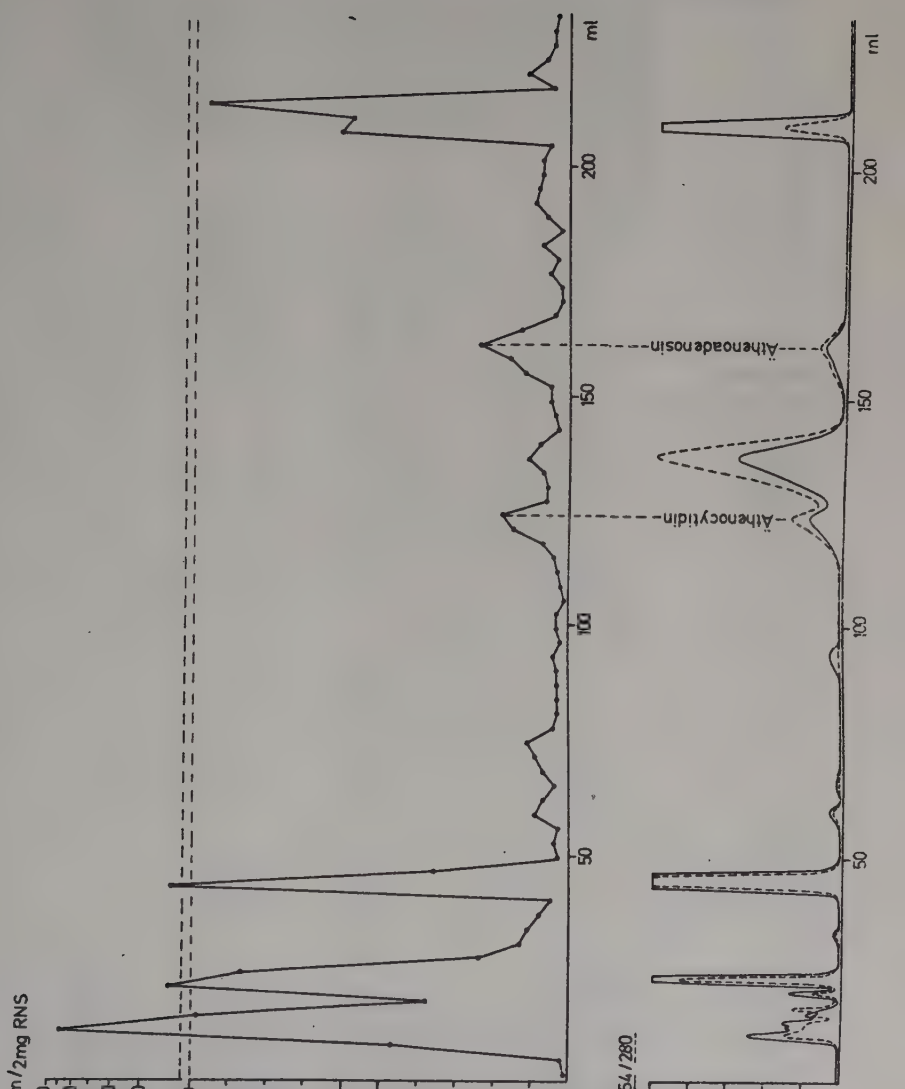

Zpm/2mg RNS
700
500
300
200
100
50
ml
50
100
150
200
Athenocytidin
Athenoadenosin
E254/280
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
ml
50
100
150
200

Abb. 10

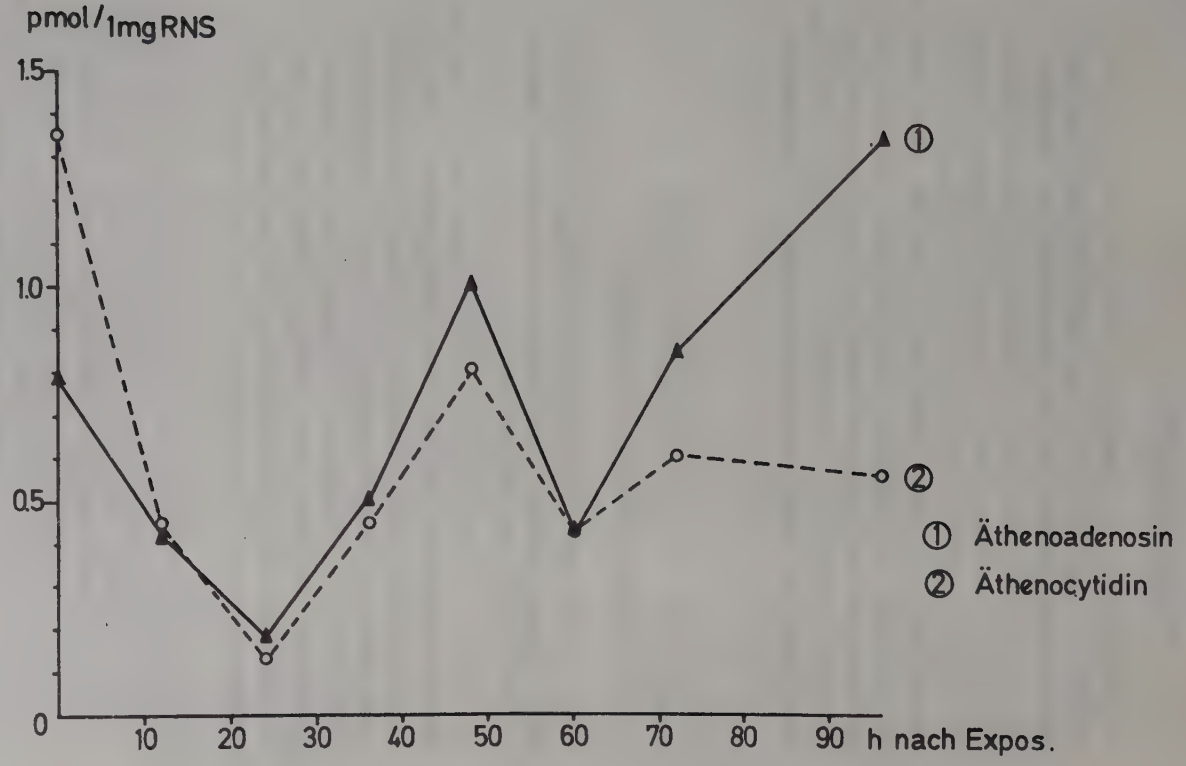
Tabelle 1: Wie bereits beschrieben, wurden Ratten gegen ^{14}C-Vinylbromid exponiert, in den angegebenen Zeitabständen nach Expositionsende durch Dekapitation getötet und aus den Lebern RNS isoliert. Angegeben sind die Mengen eingebauter Radioaktivität in die natürlichen Nukleoside und in die alkylierten Derivate von Adenosin und Cytidin in pmol gebundenem Vinylbromid.

	pmol $VBr_{geb.}$ mg^{-1} RNS							
	Stunden nach Exposition							
	0	12	24	36	48	60	72	96
Adenosin[a)]	5,2	25,4	24,1	12,8	17,0	26,4	57,0	39,2
Äthenoadenosin	1,4	0,5	0,2	0,5	0,8	0,4	0,6	0,6
Äthenocytidin	0,8	0,4	0,2	0,5	1,0	0,5	0,9	1,4
Cytidin	0,5	5,7	5,6	4,8	4,0	4,7	5,1	5,1
Guanosin	3,9	44,6	41,7	32,3	29,0	38,9	62,4	49,0
Uridin	5,7	12,1	15,2	15,3	8,1	9,5	12,3	11,5

a) als Adenin eluiert

Zu Abb. 11: Isolierbare Mengen Äthenoadenosin und Äthenocytidin in Abhängigkeit von der Zeit nach Exposition der Ratten gegenüber ^{14}C-Vinylbromid.

Abb. 11


pmol / 1mg RNS
1.5
1.0
0.5
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
h nach Expos.
①
②
① Äthenoadenosin
② Äthenocytidin

4.1.3. Alkylierung von DNS

Das Problem der Alkylierung von DNS durch reaktive Metabolite von Vinylchlorid und Vinylbromid ist als mögliche Ursache von Kanzerogenität und Mutagenität von besonderem Interesse. Die Halbwertszeit der metabolisch gebildeten Epoxide ist kurz (3) und die kovalente Bindung an Protein ist größer als die an Nukleinsäuren (14), so daß die nukleäre Konzentration an reaktiven Metaboliten klein sein muß gegenüber ihrer Konzentration im Cytoplasma. Doch könnten durch das kernmembranständige Monooxygenasesystem (22, 47,52,76), das durch Phenobarbital und 3-Methylcholanthren induzierbar ist (77), reaktive Metabolite in genügend hoher Konzentration entstehen, um DNS im Kern zu alkylieren.

4.1.3.1. Alkylierung von DNS in vitro

Abb. 12 zeigt die Chromatographie hydrolysierter DNS aus Kalbsthymus, inkubiert mit Rattenlebermikrosomen, NADPH-regenerierendem System und ^{14}C-VBr.

Die Mengen an Radioaktivität, die in Koinzidenz mit den zugesetzten optischen Markern Äthenodesoxyadenosin und Äthenodesoxycytidin eluiert werden, sind sehr gering, d.h. DNS wird unter den Versuchsbedingungen praktisch nicht alkyliert, was durch die Doppelsträngigkeit der DNS erklärt werden kann. Dagegen findet sich Radioaktivität in RNS-Nukleosiden, wobei die RNS entweder aus dem DNS-Präparat und/oder den Mikrosomen stammt.

Zu Abb. 12: Chromatogramm hydrolysierter DNS, die mit Mikrosomen aus Rattenleber und ^{14}C-Vinylbromid inkubiert wurde, an Aminex A-6. Oben: Eluierte Radioaktivität, unten: Eluiertes UV-absorbierendes Material. 1,N^6-Äthenoadenosin, 3,N^4-Äthenocytidin sowie deren Desoxy-Analoga wurden als optische Marker dem Hydrolysat zugesetzt.

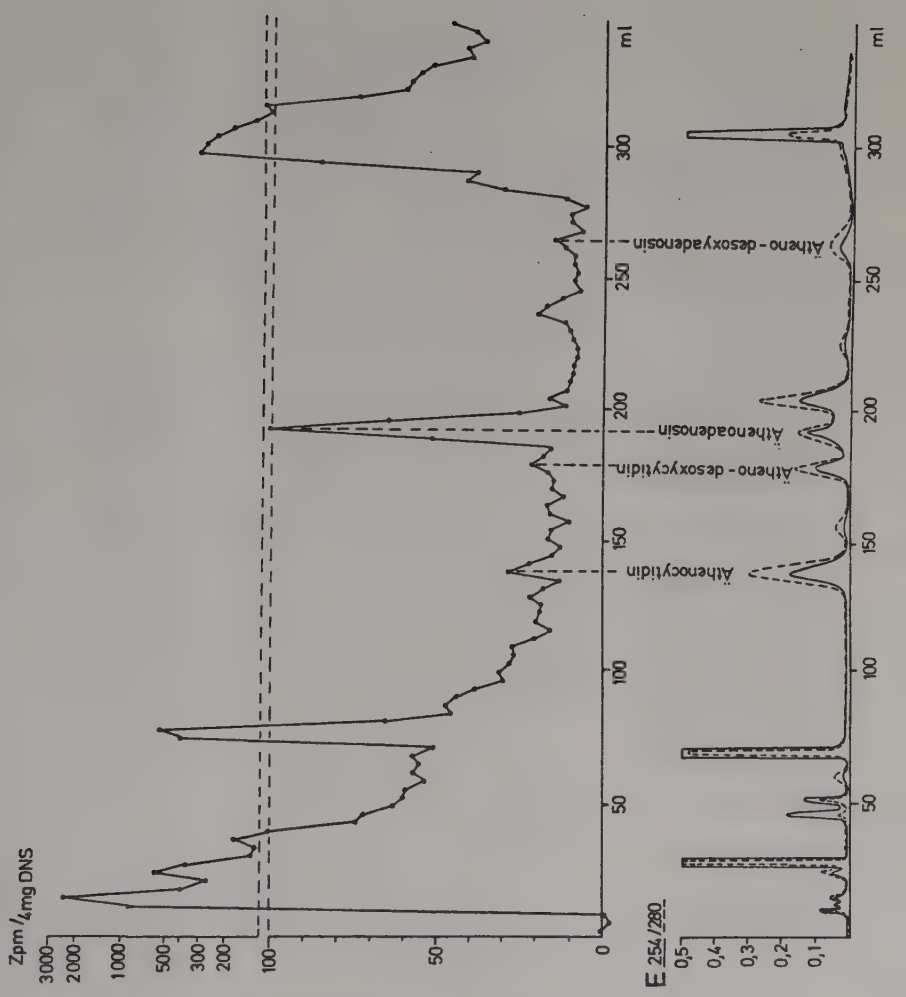

Zpm / 4mg DNS
3000
2000
1000
500
300
200
100
50
0
50
100
150
200
250
300
ml
Athenocytidin
Atheno - desoxycytidin
Athenoadenosin
Athen - desoxyadenosin
E 254/280
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
50
100
150
200
250
300
ml

Abb. 12

4.1.3.2. Alkylierung von DNS in vivo

Nach den obigen Ergebnissen war es nicht zu erwarten, daß DNS in vivo so alkyliert wird, daß nachweisbare Mengen an Äthenoderivaten in den Hydrolysaten zu erhalten sind. Dies bestätigt Abb. 13, die Chromatographie eines Hydrolysats von DNS aus Leber 24 h nach Expositionsende. Äthenodesoxycytidin und Äthenodesoxyadenosin sind praktisch nicht vorhanden, während kontaminierende hnRNS alkylierte Derivate - Äthenocytidin und Äthenoadenosin - in deutlicher Menge geliefert hat. Der geringe Turnover von DNS zeigt sich durch die im Vergleich zu RNS niedrige Inkorporation von Radioaktivität in die natürlichen d-Nukleoside.

Auffallend ist der nicht vollständig abgetrennte Radioaktivitätspeak, der mit d-Guanosin eluiert wird. Unter den Chromatographiebedingungen konnte dieser Peak im Gegensatz zu den analogen Experimenten mit Vinylchlorid (57) nicht aufgetrennt werden. Möglicherweise handelt es sich um ein Äthenoderivat des Guanosins, wie es vor kurzem von SATTSANGI et al. (44) beschrieben wurde.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß durch die Doppelsträngigkeit der DNS die Basen Adenin und Cytosin weitgehend vor Alkylierung bewahrt werden, während Guanosin den Hauptangriffspunkt für reaktive Metabolite halogenierter Äthylene darstellt.

Zu Abb. 13: Chromatogramm hydrolysierter DNS aus Leber von Ratten, die gegen ^{14}C-Vinylbromid exponiert wurden. Spezifikationen siehe Abbildung 12.

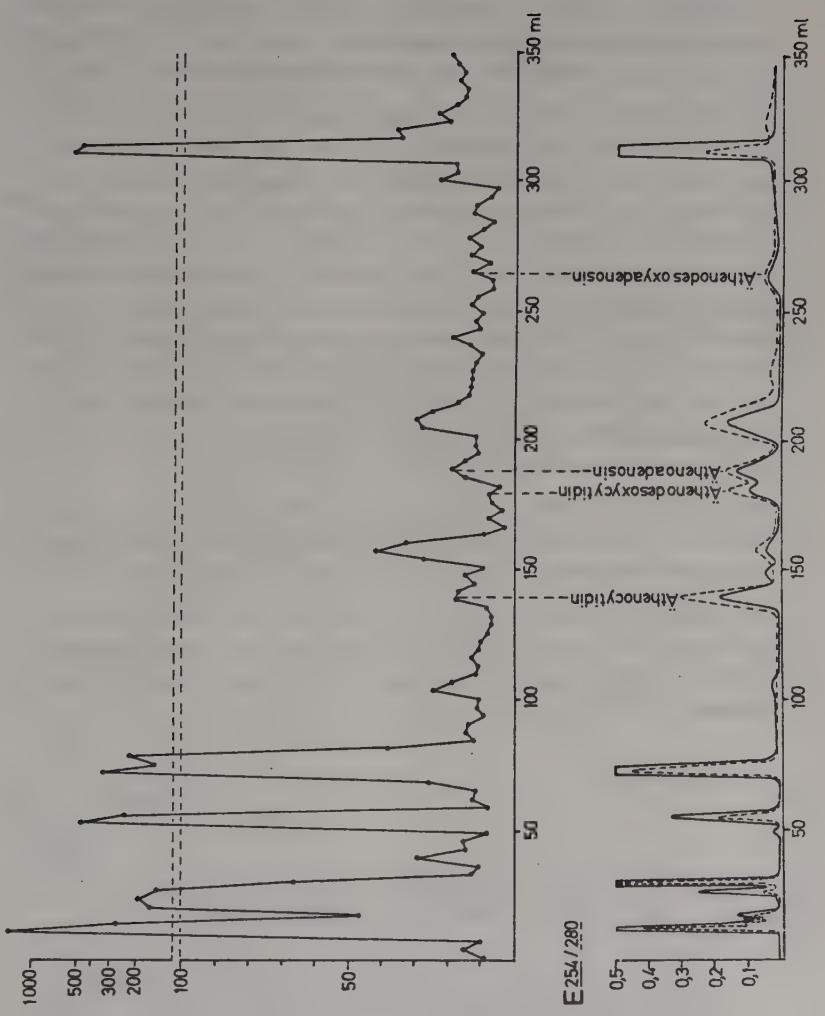

Zpm/4mg DNS
1000
500
300
200
100
50
Athenocytidin
Athenodesoxycytidin
Athenoadenosin
Athenodesoxyadenosin
350 ml
E 254/280
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1

Abb. 13

4.2. mRNS-Alkylierung und Proteinbiosynthese in vitro

In ersten, orientierenden Versuchen sollten die Auswirkungen der Alkylierung von mRNS durch VC und VBr im Proteinbiosynthesesystem in vitro untersucht werden.

Poly(A)-haltige RNS findet sich sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma. Die Funktion des etwa 200 Reste Adenylsäure zählenden 3'-Endes von mRNS ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine Funktion wird im Transport der im Kern synthetisierten hnRNS, Vorstufe von mRNS, vom Syntheseort ins Zytoplasma gesehen (46), eine zweite in der Kontrolle der Proteinbiosynthese durch schrittweises Kürzen der Poly(A)-Kette (38,98). Das Vorhandensein des Poly(A)-Endes an RNS mit Messengeraktivität wird zur Isolierung genutzt, indem solche RNS selektiv an Oligo(dT)-Cellulose gebunden wird. Der hohe Anteil Poly(A)-freier mRNS (74) kann damit jedoch nicht erfaßt werden.

Da Adenosin in RNS nach den vorliegenden Ergebnissen bevorzugt von reaktiven Metaboliten von VC und VBr angegriffen wird, waren die Versuche dringend erforderlich.

Je 6 Ratten wurden je 8 h 2000 ppm VBr bzw. 200 ppm VBr exponiert und aus der Leber, wie beschrieben, mRNS isoliert und auf mRNS-Aktivität im Translationssystem in vitro getestet.

4.2.1. Zeitabhängigkeit der Proteinbiosynthese in vitro

Zur Optimierung der Inkubationsdauer der Testansätze mußte der Einbau von ^{35}S-Methionin in die durch das Translationssystem synthetisierten Proteine in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt werden.

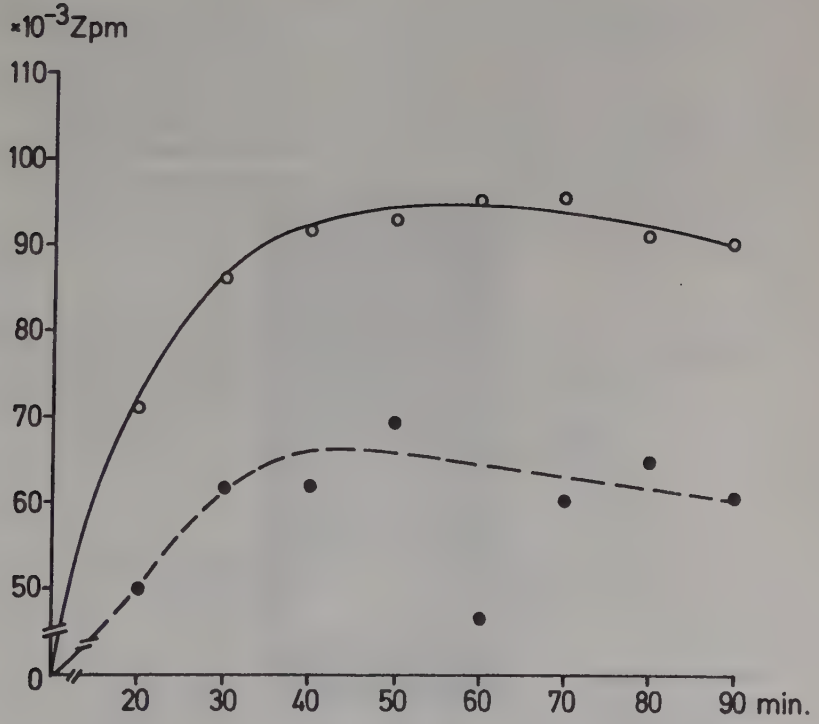


Abb. 14: Zeitabhängigkeit des Einbaus von ^{35}S-Methionin in Protein durch ein Weizenkeim-Translationssystem in vitro. Jeweils 6 µg RNS aus Leber unbehandelter Ratten (-o--o-) und gegen 2000 ppm Vinylbromid exponierter Ratten (-o—o-) wurde in das Translationssystem eingesetzt.

Wie Abb. 14 zeigt, wird nach 40-minütiger Inkubation ein Plateau des Radioaktivitätseinbaus erreicht. Die optimale Inkubationsdauer für die auf mRNS-Aktivität zu testenden RNS-Proben war deshalb beim verwendeten Translationssystem 40 Minuten.

4.2.2. Bestimmung der Gesamtsynthese

Es wurden je 6 mRNS-Proben aus Tieren, die 8 h gegenüber 200 ppm bzw. 2000 ppm Vinylbromid exponiert worden waren, im Weizenkeim-Translationssystem auf ihre biologische Aktivität geprüft. Diese biologische Aktivität wurde als Steigerung der Synthese an Protein gegenüber der endogenen Aktivität des Leerwerts (Stimulierungsfaktor) ausgedrückt. Tabelle 2 gibt eine Zusammenstellung der Ergebnisse.

Tabelle 2: Gesamt-Proteinbiosynthese im Weizenkeim-Translationssystem durch Poly(A)-haltige mRNS aus unbehandelten Tieren (Kontrolle) und 8 h gegenüber 200 ppm bzw. 2000 ppm Vinylbromid exponierten Tieren. n gibt die Zahl unabhängiger Versuche an; angegeben sind Mittelwert ± Standardabweichung.

	n	Ipm	Stimulierungsfaktor
Leerwert	2	19 200 ± 200	
Kontroll-mRNS	11	232 400 ± 57 400	12.8 ± 3,26
$mRNS_{VBr\ 2000}$	6	225 600 ± 31 100	12,5 ± 2,27
$mRNS_{VBr\ 200}$	6	212 600 ± 17 600	11,1 ± 0,92

Die Unterschiede zwischen den mRNS-Aktivitäten exponierter und nichtexponierter Tiere war nicht signifikant, da die

Syntheseleistung der RNS aus Kontrolltieren eine sehr breite Streuung aufwiesen, die eventuell auf biologische Ungleichheiten zurückgeführt werden muß.

Es deutet sich jedoch eine Minderung der Translationsfähigkeit alkylierter mRNS gegenüber mRNS aus Kontrolltieren an.

4.2.3. Elektrophoretische Auftrennung der synthetisierten Proteine

Von den Inkubationsansätzen der Proteintranslation in vitro wurde jeweils die Menge zur Elektrophorese aufgetragen, die nach Radioaktivitätsmessung 200 000 Ipm enthielt.

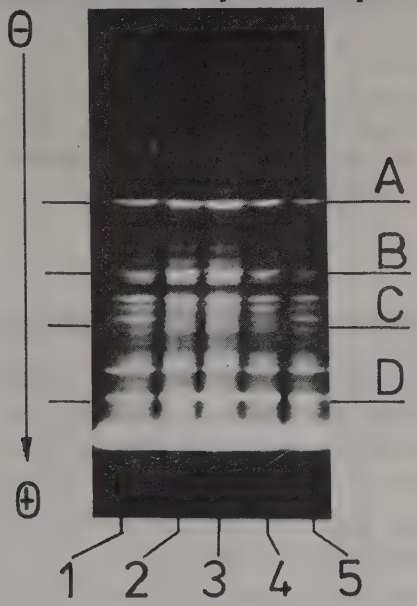


Abb. 15: Kontaktabzug einer fluorographisch ausgewerteten SDS-Disk-Elektrophorese von 2 Inkubationsansätzen des Translationssystems in vitro, die durch mRNS aus Kontrolltieren stimuliert wurden (1,5) und 3 mit mRNS aus exponierten Tieren (2000 ppm VBr) stimulierten Inkubationsansätzen (2,3,4).

Die elektrophoretisch aufgetrennten Banden wurden fluorographisch,wie im methodischen Teil beschrieben, untersucht. Im Bandenmuster der synthetisierten Proteine sind Unterschiede zwischen Proben der Kontrolltiere und Proben exponierter Tiere sichtbar (Abb. 15).

Die mit A, B und D bezeichneten Proteinbanden nehmen mengenmäßig zu, während die mit D bezeichnete Bande neu auftritt. Es wird damit wahrscheinlich, daß auch sehr geringe Alkylierungsraten der mRNS die Proteinbiosynthese in vivo beeinflussen könnten.

4.3. Metabolisierung von ^{14}C-Vinylbromid und ^{14}C-Vinylchlorid durch Parenchym- und Sinusoidalzellen

Die durchgeführten Experimente sollten ein Beitrag sein zur Diskussion der von POPPER (85) und SCHAFFNER (95) aufgestellten Hypothese, daß Sinusoidalzellen durch reaktive Metaboliten, die durch die Membran von Hepatocyten permeierten, geschädigt werden.

4.3.1. Isolierung von Hepatozyten und Sinusoidalzellen

Für die Isolierung von Hepatozyten und Sinusoidalzellen aus einer Leber wurde die Methode von KREUSCH et al. (55) gewählt, da sie erfolgversprechend schien, beide Zellarten in kurzer Zeit und genügender Reinheit zu erhalten.

Einen Überblick über die wichtigsten Daten und Parameter der Zellenisolierung gibt Tabelle 3.

Die Ausbeute an Hepatozyten stimmt mit der Literatur überein (40), während die Ausbeute an Sinusoidalzellen unter dem in der Literatur angegebenen Wert lag (100). Die Kontamination der Sinusoidal-Zellfraktion an Hepatozyten lag erheblich über dem von KREUSCH et al. (55) angegebenen Wert

	Hepatocyten		Sinusoidalzellen	
Ausbeute x 10^{-7} g^{-1} Leber	11,3 ± 2,2		0,68 ± 0,24	
Anteil Hepatocyten %	-		10,1 ± 3,6	
	vor Inkubation	nach Inkubation	vor Inkubation	nach Inkubation
Anfärbbarkeit mit Trypanblau (%)	20,3 ± 7,3	24,3 ± 5,8	3,2 ± 0,8	5,7 ± 2,5
LDH-Aktivität % (des Homogenats)	3,9 ± 2,3	20,8 ± 9,4	16,0 ± 4,5	57,2 ± 14,0

Tabelle 3: Parameter der Simultanisolierung von Parenchym- und Sinusoidalzellen. Angegeben sind Mittelwert ± Standardabweichung (n = 6).

und konnte trotz Erhöhung der Pronasekonzentration auf 25 mg Pronase ml^{-1} und Verlängerung der Inkubationszeit auf 50 min nicht erniedrigt werden.

Auf dieser Kontamination beruht auch die drastische Erhöhung der LDH-Aktivität der Sinusoidalzellsuspension während der Inkubation. Die mit Trypanblau färbbare Zahl kontaminierender Hepatozyten stieg von durchschnittlich 48,3 % vor Beginn der Inkubation auf durchschnittlich 69,9 % am Inkubationsende an.

4.3.2. Inkubation mit ^{14}C-Vinylbromid und ^{14}C-Vinylchlorid und Bestimmung der kovalenten Bindung

Wie unter Methoden beschrieben, wurden die isolierten Zellen mit ^{14}C-VBr und ^{14}C-VC inkubiert (3.3.2. und 3.4.3.). Die Geschwindigkeit, mit der die O_2/VC bzw. O_2/VBr Athmosphäre des Systems umgewälzt wurde, betrug ca. 50 ml min^{-1}. Den Inkubationsgefäßen wurden alle 5 min Proben entnommen und wie im methodischen Teil beschrieben aufgearbeitet. Die Partialdrucke der Gase betrugen bei den einzelnen Versuchen zwischen 27,6 Pa und 300,3 Pa (0,21 Torr und 2,25 Torr).

Abb. 16 zeigt ein typisches Diagramm der zeitlichen Abhängigkeit der Bindung reaktiver Metabolite von ^{14}C-Vinylchlorid an Protein. Zur Erhöhung der Lebensfähigkeit der Zellen enthielt das Medium 25,5 g BSA l^{-1}, d.h. die Zellen eventuell verlassende Metabolite wurden von BSA gebunden. Die gesamte, an Zellprotein und BSA gebundene Radioaktivität wurde erfaßt und auf 10^6 Zellen normiert. Durch das Medium gebundene Radioaktivität, im zellfreien Ansatz als Kontrolle bestimmt, wurde von den einzelnen Meßwerten subtrahiert. Die metabolische Aktivität der die Sinusoidalzellsuspension verunreinigenden Hepatocyten wurde berücksichtigt. Das Diagramm zeigt klar, daß die Sinusoidalzellen Vinylchlorid nur in einem untergeordneten Maße metabolisieren.

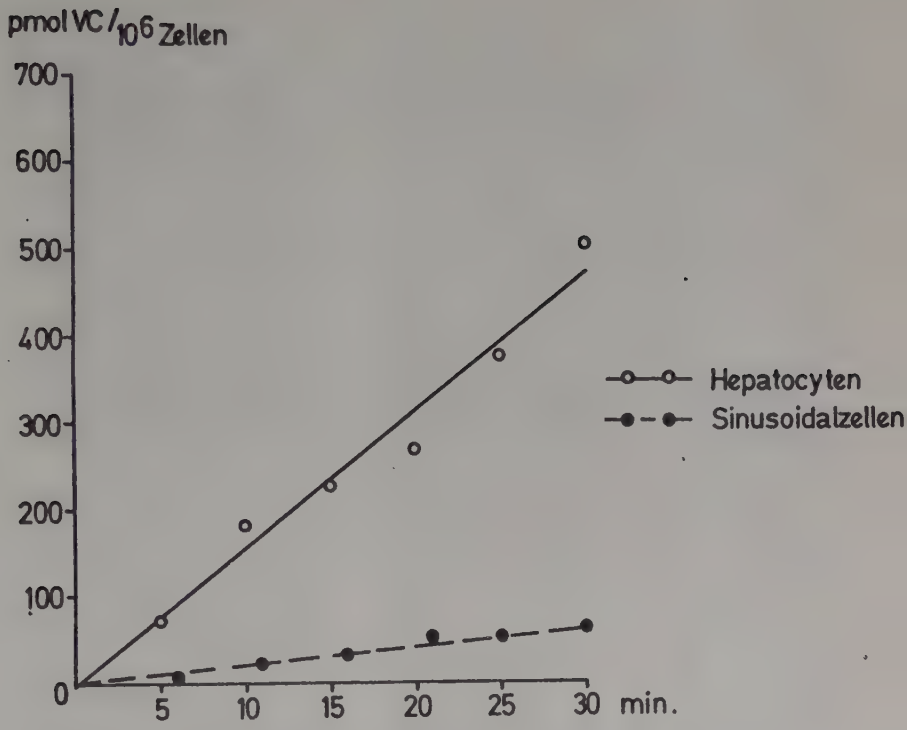


Abb. 16: Kovalente Bindung reaktiver Metabolite von Vinylchlorid an Protein durch Hepatocyten und Sinusoidalzellen. Suspensionen beider Zellpopulationen wurden mit ^{14}C-Vinylchlorid über 30 min inkubiert. Der Partialdruck an Vinylchlorid betrug 73,0 Pa (0,55 Torr).

Tabelle 4

Inkubationszeit (min)[a]				5	10	15	20	25	30
Versuch (Carcinogen)	p in Pa p in Torr	Zellzahl[b] $\times 10^{-6}$ Zellen ml^{-1}		pmol Carcinogen$_{geb.}$ $(10^6$ Zellen$)^{-1}$					
A (VC)	56,6 (0,42)	H-Zellen	3,77	94,6	190,2	289,7	360,3	448,7	563,8
		S-Zellen	8,05	12,3	22,9	26,9	32,1	37,2	42,4
		(H-Anteil)[c]	0,60						
		%[d]		13,0	12,0	9,3	8,9	8,3	7,5
B (VC)	153,6 (1,15)	H-Zellen	1,14	180,5	360,5	409,5	437,0	487,9	562,1
		S-Zellen	6,84	0,3	1,3	--	--	--	--
		(H-Anteil)	0,29						
		%		0,2	0,4	--	--	--	--
C (VC)	73,0 (0,55)	H-Zellen	2,71	69,7	178,5	228,5	270,3	377,7	502,1
		S-Zellen	10,27	4,5	18,1	28,7	46,3	51,3	59,8
		(H-Anteil)	0,33						
		%		6,5	10,1	12,6	17,1	13,6	11,9
D (VBr)	181,3 (1,36)	H-Zellen	2,26	53,4	63,5	108,0	148,2	150,5	179,0
		S-Zellen	3,74	--	--	31,9	34,8	53,7	55,5
		(H-Anteil)	0,14						
		%		--	--	29,5	23,5	35,7	31,0

[a] Da die Proben nicht zu gleichen Zeiten entnommen werden konnten, wurde zum besseren Vergleich auf gleiche Zeiten umgerechnet unter der Annahme der Linearität zwischen den Meßpunkten

[b] Berücksichtigt wurden nur die Trypanblau ausschließenden Zellen. Der Mittelwert der Auszählung der Zellen vor und nach der Inkubation wurde verwendet.

[c] Anteil der Trypanblau ausschließenden Hepatocyten in der Sinusoidalzellsuspension

[d] % metabolische Aktivität der S-Zellen (H-Zellen = 100 %)

Eine zusammenfassende Darstellung mehrerer Versuche wird in Tabelle 4 gegeben. Die metabolische Aktivität der Sinusoidalzellen liegt weit unterhalb derjenigen der Parenchymzellen und ist teilweise nicht mehr meßbar (--). Des weiteren läßt Versuch D erkennen, daß bei Metabolisierung von ^{14}C-Vinylbromid weniger reaktive Metabolite kovalent binden als bei Vinylchlorid. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Alkylierung von Nukleinsäuren (4.1.) sowie mit der unterschiedlichen irreversiblen Bindung an Protein von Vinylbromid und Vinylchlorid in vitro (14,67).

Die Daten unterstützen eindeutig die Hypothese von POPPER (85) und SCHAFFNER (95), nach der nur Hepatocyten fähig sind, Kanzerogene wie Vinylbromid und Vinylchlorid zu metabolisieren.

Zu Tabelle 4: Kovalente Bindung reaktiver Metabolite halogenierter Äthylene an Protein durch Hepatocyten (H-Zellen) und Sinusoidalzellen (S-Zellen). Suspensionen beider Zellpopulationen wurden mit radioaktiv markierten, halogenierten Äthylenen 30 min inkubiert.

5. DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Wirkungen von Vinylbromid mit den Wirkungen von Vinylchlorid auch in biochemischer Hinsicht durchaus vergleichbar sind.

5.1. Alkylierung von Nukleinsäuren durch reaktive Metabolite von Vinylbromid

Die vorgelegten Daten aus den Alkylierungsexperimenten machen deutlich, daß Metabolite von Vinylbromid Nukleinsäuren der Leber alkylieren können.

Angriffspunkte für die Metabolite sind bei Ribonukleinsäuren Adenosin und Cytidin. Aus diesen beiden Nukleosiden werden 1,N^6-Äthenoadenosin bzw. 3,N^4-Äthenocytidin gebildet. In dieser Hinsicht verhalten sich die Metabolite von Vinylbromid sehr ähnlich wie die des Vinylchlorids, die dieselben Alkylierungsprodukte liefern (57,58,59).

Der Einbau von Radioaktivität aus ^{14}C-Vinylbromid in Nukleinsäuren kann sowohl auf der Utilisation von VBr-Metaboliten bei der Purin- oder Pyrimidinsynthese als auch auf der Alkylierung von Basen beruhen. Frühere Experimente mit ^{14}C-Vinylchlorid haben gezeigt, daß der überwiegende Anteil der Radioaktivität in RNS aus Leber von Ratten, die gegen ^{14}C-VC exponiert worden waren, der Markierung der natürlichen Basen zukommt, d.h. der Verwendung von C_1- und/oder C_2-Fragmenten von Vinylchlorid für die Nukleotidbiosynthese (57,58). Dies bedeutet, daß der Radioaktivitätseinbau in Nukleinsäuren allein kein Maß für das Ausmaß der Alkylierung liefert, sondern daß die Nukleinsäuren hydrolysiert und die natürlichen und alkylierten Nukleoside separiert werden müssen.

Einige Unterschiede im Alkylierungsmuster der Metabolite von Vinylchlorid und Vinylbromid sind offensichlich. Die Experimente in vitro zeigen, daß ein zweites Alkylierungs-

produkt von Cytidin bei der Reaktion mit VBr-Metaboliten gebildet worden sein muß, das bei Vinylchlorid nicht beobachtet werden konnte (57,58). Auch in den Hydrolysaten von RNS, die mit ^{14}C-VBr und Rattenlebermikrosomen inkubiert worden war (Abb. 9) und von RNS aus Leber von Ratten, die gegen ^{14}C-VBr exponiert worden waren (Abb. 10), tritt ein alkyliertes Nukleosid auf, das nach Exposition gegen VC nicht beobachtet werden konnte (57,58).

Die Bildung der beiden Äthenoderivate (1,N^6-Äthenoadenin und 3,N^4-Äthenocytosin) ist auch bei der DNS nachweisbar, wenn DNS mit Lebermikrosomen und Vinylbromid inkubiert wird (Abb. 12). Es fällt jedoch auf, daß insbesondere ein Alkylierungsprodukt im Hydrolysat erscheint, das kurz hinter Desoxyguanosin von der Säule eluiert wird (Abb. 12). Werden Ratten gegenüber ^{14}C-Vinylbromid exponiert, so lassen sich die Äthenoalkylierungsprodukte von Desoxyadenosin und Desoxycytidin kaum in signifikanter Menge nachweisen (Abb. 13). Auch hier wird ein Alkylierungsprodukt gebildet, das kurz hinter Desoxyguanosin eluiert wird. Da wegen des Radioaktivitäteinbaus in die natürlichen Basen nach Exposition gegen ^{14}C-Vinylbromid in vivo auch Desoxyguanosin im DNS-Hydrolysat markiert ist, erscheinen zwei markierte Substanzen im Säuleneluat (Abb. 13) sehr kurz hintereinander (d-Guanosin und das fragliche Alkylierungsprodukt). Sie konnten trotz aller Bemühungen nicht vollständig separiert werden. Auch nach entsprechender Exposition gegen ^{14}C-Vinylchlorid entsteht ein ähnliches Alkylierungsprodukt, das jedoch im gleichen Chromatographiesystem stets von d-Guanosin abtrennbar war (57). Dies läßt vermuten, daß die beiden nach Exposition gegen Vinylbromid und Vinylchlorid entstehenden fraglichen Alkylierungsprodukte nicht vollkommen identisch sind. Im übrigen entsprechen die Befunde der Alkylierung von Nukleinsäuren durch reaktive Metabolite von Vinylbromid denen, die mit Vinylchlorid erhalten wurden (57). Dies gilt auch für die Alkylierung von Polyadenylsäure und Polycytidylsäure durch Vinylbromid im metabolisierenden System in vitro.

Insgesamt stimmen die vorgelegten Daten mit dem von BARTSCH postulierten Konzept überein (3,4), daß der Metabolismus von Vinylbromid analog zu dem des Vinylchlorid über Bromäthylenoxid und Bromacetaldehyd verläuft. Hiermit stimmt auch die früher nachgewiesene Alkylierung von Proteinen durch reaktive Metabolite von Vinylbromid (10), sowie die Mutagenität von VBr-Metaboliten in bakteriellen Testsystemen (4) überein. In dieses Bild fügt sich ferner die Depletion des hepatozellulären Glutathion unter Exposition gegenüber Vinylbromid sowie die Steigerung des Vinylbromid-Metabolismus nach Phenobarbitalgabe (27) ein.

Auch die Auswirkungen reaktiver Metabolite auf die biologische Aktivität Poly(A)-haltiger mRNS - Verminderung der Proteinsynthese und veränderte Zusammensetzung der synthetisierten Proteine - gleichen bei Vinylbromid denen bei Vinylchlorid (57). Die Verminderung der Menge insgesamt synthetisierten Proteins ist, zwar nicht signifikant, doch tendenziell erkennbar, nicht so stark wie bei Vinylchlorid, doch sind auch hier Veränderungen in der Zusammensetzung der synthetisierten Proteine deutlich zu sehen (Abb. 15).

5.2. Zur malignen Entartung von Leberzellen nach Exposition gegen Vinylbromid und Vinylchlorid

Es wurde einleitend bereits ausgeführt, daß Hepatocyten und Sinusoidalzellen in ihrer Ansprechbarkeit gegenüber den chemischen Karzinogenen Vinylbromid und Vinylchlorid unterschiedlich reagieren.

Bei jungen Individuen mit hoher Zellteilungsrate der Parenchymzellen lassen sich sowohl durch Vinylchlorid als auch durch Vinylbromid leicht hepatozelluläre Tumoren erzeugen. Ähnliche Bedingungen liegen beim experimentellen Modell der partiell hepatektomierten Ratte vor. Auch hier sind die Hepatocyten empfindlich gegenüber der karzinogenen Wirkung von Vinylchlorid (16). Während beim erwachsenen

Tier die Proliferationsrate der Hepatocyten nur äußerst gering ist, liegt sie bei den Sinusoidalzellen bedeutend höher. Dies führt dazu, daß beim erwachsenen Organismus die Sinusoidalzellen der Leber gegenüber Vinylchlorid bzw. Vinylbromid erheblich empfindlicher reagieren als die Hepatocyten. Vorausbedingung für eine kanzerogene Wirkung beider Stoffe ist jedoch deren metabolische Umwandlung in die karzinogen wirkenden Zwischenprodukte.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen das Konzept von SCHAFFNER (Abb. 2), nachdem der oxidative Metabolismus von Vinylbromid bzw. Vinylchlorid in der Leber im endoplasmatischen Retikulum der Leberparenchymzellen lokalisiert ist. Die reaktiven Metabolite müssen also die Hepatocyten verlassen, um auf die benachbarten Sinusoidalzellen einwirken zu können. Nach den bislang vorliegenden Daten (16) muß angenommen werden, daß der reaktive Metabolit, der in dieser Weise aus den Hepatocyten heraus auf Sinusoidalzellen einwirkt, Chloracetaldehyd ist. Hierfür sprechen die Wasserlöslichkeit des Chloracetaldehyds und seine starke direkte Mutagenität; andererseits ist das ebenfalls theoretisch in Frage kommende Chloräthylenoxid zwar äußerst reaktiv, aber in wäßriger Phase nach neuesten Untersuchungen kaum beständig (42).

Die Annahme der Permeation eines reaktiven Vinylchloridmetaboliten durch die Membran der Leberparenchymzellen wird gestützt durch die Befunde von LAIB (57,60), denen zufolge reaktive Metaboliten in der Lage sind, durch Membranen zu permeieren.Dies konnte anhand eines in vitro-Systems mit künstlichen Polyamidmembranen gezeigt werden.

Sämtliche nun vorliegenden Daten führen zu dem Konzept, daß zwei verschiedene Faktoren für den zellulären onkogenen Effekt von Vinylchlorid bzw. Vinylbromid maßgeblich sind: die metabolische Aktivierung und die Proliferationsrate der verschiedenen Zellpopulationen. Unterschiede zwischen Vinylbromid und Vinylchlorid dürften in erster Linie quantitativer Natur sein und können zum Teil auf die unterschiedliche Geschwindigkeit ihrer Metabolisierung in der Leber zurückgeführt werden (29).

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Metabolisch gebildete reaktive Intermediärprodukte von Vinylchlorid alkylieren Nukleinsäuren unter Bildung von 1,N^6-Äthenoadenosin und 3,N^4-Äthenocytidin sowie deren Desoxy-Analoga. Die vermuteten reaktiven Metabolite sind Chloräthylenoxid und Chloracetaldehyd. Die analogen Bromverbindungen wurden in der Literatur postuliert, so daß durch Metabolisierung von Vinylbromid zumindest ähnliche Alkylierungsprodukte in Nukleinsäuren zu erwarten waren.

Experimente mit einem metabolisierenden System in vitro ergaben, daß sowohl mit artifiziellen Nukleinsäuren wie Polyadenylsäure und Polycytidylsäure wie auch mit RNS durch reaktive Metabolite von Vinylbromid Äthenoadenosin und Äthenocytidin gebildet werden. Auch bei Versuchen in vivo, bei denen Ratten gegen ^{14}C-Vinylbromid exponiert wurden, konnten diese Alkylierungsprodukte nachgewiesen werden, jedoch in erheblich geringerer Menge als bei Vinylchlorid.

Die analogen Alkylierungsprodukte der DNS wurden, wenn überhaupt, in äußerst geringer Menge gebildet. Dagegen wird in erheblichem Ausmaß Desoxyguanosin alkyliert, jedoch konnte das Alkylierungsprodukt im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Vinylchlorid nicht vollständig von d-Guanosin abgetrennt werden. Die erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, daß der Metabolismus von VBr nicht genau dem des VC entspricht.

2. Die Auswirkungen der Alkylierung von mRNS durch reaktive Metabolite von Vinylbromid wurden in einem Weizenkeim-Translationssystem in vitro untersucht. Poly(A)-tragende RNS wurde aus der Leber unbehandelter Tiere und aus Tieren, die gegen verschiedene Konzentrationen Vinylbromid exponiert worden waren, isoliert und zur Translation in vitro eingesetzt.

Die Proteinbiosynthese, stimuliert durch mRNS aus exponierten Tieren, war nicht signifikant vermindert im Vergleich zur Proteinbiosynthese, die durch mRNS aus unbehandelten Tieren stimuliert wurde. Jedoch zeigten sich qualitative und quantitative Unterschiede der durch alkylierte und nichtalkylierte mRNS translatierten Proteine. Durch alkylierte mRNS translatierte Proteine ergaben bei der elektrophoretischen Auftrennung eine neue Proteinbande sowie mehrere Banden, die mengenmäßig zunahmen, verglichen mit dem Bandenmuster aus Proteingemischen, die durch nichtalkylierte mRNS translatiert worden waren.

3. Das Problem der chemischen Kanzerogenese führte auf dem Gebiet der Lebertumoren zu der Hypothese, daß Sinusoidalzellen durch reaktive Metabolite aus den Hepatocyten geschädigt werden, da nur diese die notwendige Enzymausstattung zur Metabolisierung in Frage kommender Fremdstoffe in ausreichendem Maße besitzen.

   Die simultane Isolierung von Parenchym- und Sinusoidalzellen aus einer Leber ermöglichte zu prüfen, ob die beiden Zellpopulationen halogenierte Äthylene im gleichen Ausmaß metabolisieren können. Mit der kovalenten Bindung reaktiver Metabolite an Protein als Maß für die metabolische Aktivität konnte gezeigt werden, daß sowohl Vinylbromid als auch Vinylchlorid in überwiegendem Maße nur von Hepatocyten metabolisiert wird. Die metabolische Aktivität der Sinusoidalzellen betrug nur 1/3 bis 1/10 derjenigen der Parenchymzellen. Mit diesen Ergebnissen konnte die erwähnte Hypothese stark gestützt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1 ANONYM (1977)
Chemical Week, Nov. 16, p. 40

2 AVIV, H. and LEDER, P. (1972)
Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 1408-1412

3 BARBIN, A., BRESIL, H., CROISY, A., JACQUINON, P., MALAVEILLE, C., MONTESANO, R., BARTSCH, H. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 596-603

4 BARTSCH, H., MALAVEILLE, Ch., BARBIN, A. and PLANCHE, G. (1978)
Arch. Toxicol. 41, 249-277

5 BARTSCH, H., MALAVEILLE, C. and MONTESANO, R. (1975)
Int. J. Cancer 15, 429-437

6 BARTSCH, H. and MONTESANO, R. (1975)
Mutat. Res. 32, 93-114

7 BERGMEYER, H.U. und BERNT, E. (1974)
in:"Methoden der enzymatischen Analyse" (ed. Bergmeyer, H.U.) pp. 607-615
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1974

8 BOLT, H.M. (1978)
in: "Primary Liver Tumors" (Remmer, H., Bolt, H.M., Bannasch, P., Popper, H., eds.) pp. 285-294
MTP Press, Falcon House, Lancaster, England, 1978

9 BOLT, H.M. and FILSER, J.G. (1977)
Env. Hlth. Perspectives 21, 107-112

10 BOLT, H.M., FILSER, J.G. and HINDERER, R.K. (1978)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 44, 481-489

11 BOLT, H.M., FILSER, J.G., LAIB, R.J. and OTTENWÄLDER, H. (1979)
Arch. Toxicol. Suppl. 3, in press

12 BOLT, H.M., KAPPUS, H., BUCHTER, A., und BOLT, W. (1976)
Verh. Dtsch. Ges. Arbeitsmedizin 16, 181-186

13 BOLT, H.M., KAPPUS, H., BUCHTER, A. and BOLT, W. (1976)
Arch. Toxicol. 35, 153-162

14 BOLT, H.M., KAPPUS, H., KAUFMANN, R., APPEL, K.E., BUCHTER, A. and BOLT, W. (1976)
Environmental pollution and cancerogenic risk.
INSERM Symposia Series (Paris) 52, 151-163

15 BOLT, H.M., LAIB, R.J., FILSER, J.G., OTTENWÄLDER, H., STÖCKLE, G., BUCHTER, A. and BOLT, W. (1979)
Verh. Dtsch. Ges. Arbeitsmedizin 19, im Druck

16 BOLT, H.M., LAIB, R.J. and OTTENWÄLDER, H. (1979)
in: "Communications of Liver Cells" (Bianchi, L., Gudat, F., Reutter, W., eds.)
MTP Press, Lancaster, England, in press

17 BOLT, H.M. and REMMER, H. (1976)
Xenobiotica 6, 21-32

18 BONNER, W.M. and LASKEY, R.A. (1975)
Eur. J. Biochem. 46, 83-88

19 BONNETON, G., CHAMPETIER, J., SOTTO, J.J., GUIDICELLI, H., LETOUBLON, C. et PAHN, M. (1975)
Chirurgie 101, 936-942

20 BONSE, G. and HENSCHLER, D. (1976)
CRC Crit. Rev. Toxicol. 5, 395-409

21 BRAY, G.A. (1960)
Anal. Biochem. 1, 279-285

22 BRESNICK, E., VAUGHT, J.B., CHAUNG, A.H.L., STOMING, T.A., BOCKMAN, D. and MUKTHAR, H. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 181, 257-269

23 CANTRELL, E. and BRESNICK, E. (1972)
J. Cell. Biol. 52, 316-321

24 CONOLLY, R.B., JAEGER, R.J. and SZABO, S. (1978)
Ex. Mol. Pathol. 28, 25-33

25 CREECH, J.L. Jr. and JOHNSON, M.N. (1974)
J. Occup. Med. 16, 150-151

26 DELORME, F. and MAKK, L. (1975)
Union Med. Can. 104, 1836-1844

27 DREW, R.T., PATEL, J.M. and VAN STEE, E.W. (1976)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 37, 176-177

28 FALK, H., CREECH, J.L., HEATH, C.W. Jr., JOHNSON, M.N. and KEY, M.M. (1974)
JAMA 230, 59-63

29 FILSER, J.G. (1979)
in: "Pharmakokinetik halogenierter Äthylene", Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Tübingen

30 GASSEN, H.G. und LEIFER, W. (1970)
Z. Anal. Chem. 252, 337-343

31 GEDIGK, P., MÜLLER, R., SCHATTENBERG, P.J. und TOTOVIC, V. (1977)
in: "Leberschäden durch Vinylchlorid" (Gutacker, H.W. und Lelbach, W.K., Hrsg.) pp 43-52
Verlag Gerhard Witzstrock, Baden-Baden, Brüssel, Köln, New York 1977

32 GEORGIEV, C.P. and MANTIEVA, V.L. (1962)
Biochim. Biophys. Acta 61, 153-154

33 GOKEL, J.M., LIEBEZEIT, E. and EDER, M. (1976)
Virchows Arch. (Pathol. Anat.) 372, 195-203

34 GREEN, T. and HATHWAY, D.E. (1975)
Chem.-Biol. Interactions 11, 545-562

35 GREEN, T. and HATHWAY, D.E. (1977)
Chem.-Biol. Interactions 17, 137-150

36 GREEN, T. and HATHWAY, D.E. (1978)
Chem.-Biol. Interactions 22, 211-224

37 GREIM, H., BONSE, G., RADWAN, Z., REICHERT, D. and HENSCHLER, H. (1975)
Biochem. Pharmacol. 24, 2013-2017

38 GRONER, B., HYNES, N. and PHILLIPS, S. (1974)
Biochemistry 13, 5378-5383

39 HENSCHLER, H. (1977)
in: "Leberschäden durch Vinylchlorid" (Gutacker, H.W. und Lelbach, W.K., Hrsg.) pp 27-31
Verlag Gerhard Witzstrock, Baden-Baden, Brüssel, Köln, New York 1977

40 HOFMANN, F., WILKENING, J., NOWACK, J. and DECKER, K. (1976)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 427-433

41 HÖKE, H., KRELL, H. and PFAFF, E. (1979)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. 307, R 26

42 HOOS, W.R., FETZ, H. and HENSCHLER, D. (1979)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. 307, R 16

43 HUBERMAN, E., BARTSCH, H. and SACHS, L. (1975)
Int. J. Cancer 16, 639-644

44 HUNTINGDON RESEARCH CENTER:
Oncogenic Potential of Vinyl Bromide during Chronic Inhalation Exposure, 18-month Sacrifice, Pathology Report, Project 7511-253, June 26, New York (1978)

45 ISHAK, K.G. (1976)
in: "Mesenchymal tumors of the liver. Hepatocellular Carcinoma". (Okuda, K. and Peters, R.L., eds.) pp 286-298
Wiley & Sons, New York, 1976

46 JELINEK, W., ADESNIK, M., SALDITT, M., SHEINESS, D., WALL, R., MOLLOY, G., PHILIPSON, L. and DARNELL, J.E. (1973)
J. Mol. Biol. 75, 515-532

47 JERNSTROM, B., VADI, H. and ORRENIUS, S. (1976)
Cancer Res. 36, 4107-4113

48 KAPPUS, H., BOLT, H.M., BUCHTER, A. and BOLT, W. (1975)
Nature (London) 257, 134-135

49 KAPPUS, H., BOLT, H.M., BUCHTER, A. and BOLT, W. (1976)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 37, 461-471

50 KAPPUS, H. and REMMER, H. (1975)
Biochem. Pharmacol. 24, 1079-1084

51 KAPPUS, H. and REMMER, H. (1975)
Drug Metab. Disp. 3, 338-344

52 KASPER, C.B. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 577-581

53 KOCHETKOV, N.K., SHIBAEV, V.N., KOST, A.A. (1971)
Tetrahydron Lett. 22, 1993-1996

54 KREBS, H.A. und HENSELEIT, K. (1932)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33-66

55 KREUSCH, J., HOFMANN, F., MAIER, K.P. and DECKER, K. (1977)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358. 1513-1516

56 LAEMMLI, U.K. (1970)
Nature 227, 680-685

57 LAIB, R.J. (1979)
in: "Molekulare Wechselwirkungen von Vinylchlorid-Metaboliten mit Nukleinsäuren", Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Tübingen

58 LAIB, R.J. and BOLT, H.M. (1977)
Toxicology 8, 185-195

59 LAIB, R.J. and BOLT, H.M. (1978)
Arch. Toxicol. 39, 235-240

60 LAIB, R.J. and OTTENWÄLDER, H. (1979)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. 307, R 17

61 LAIB, R.J., STÖCKLE, G., BOLT, H.M. and KUNZ, W. (1979)
J. Cancer Res. Clin. Oncol., in press

62 LANGE, C.-E., JÜHE, S. und VELTMAN, G. (1974)
Dtsch. Med. Wochenschr. 99, 1598-1599

63 LASKEY, R.A. and MILL, A.D. (1975)
Eur. J. Biochem. 56, 335-341

64 LEE, F.I. and HARRY, D.S. (1974)
Lancet 1, 1316-1318

65 LERMAN, M.I., ABAKUMOVA, O. Yu., KUCENCO, N.G., GORBACHEVA, L.B., KUKUSKINA, G.V. and SEREBRYANYI, A.M. (1974)
Cancer Res. 34, 1536-1541

66 LOWRY, R.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265-275

67 MAKK, L., CREECH, J.L., WHELAN, J.G. and JOHNSON, M.N. (1974)
JAMA 230, 64-68

68 MALAVEILLE, C., BARTSCH, H., BARBIN, A., CAMUS, A.M., MONTESANO, R. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 363-370

69 MALTONI, C. (1976)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 271, 431-447

70 MALTONI, C. and LEFEMINE, G. (1974)
Environ. Res. 7, 387-405

71 MALTONI, C. and LEFEMINE, G. (1975)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 246, 195-218

72 MANS, R.J. and NOVELLI, G.D. (1961)
Arch. Biochem. Biophys. 94, 48-53

73 MCCANN, J., SIMMON, V., STREITWIESER, D. and AMES, B. (1975)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3190-3193

74 MILCAREK, C., PRICE, R.P. and PENMAN, S. (1974)
Cell 3, 1-10

75 MORLAND, J. and OLSEN, H. (1977)
Drug Metab. Disp. 5, 511-517

76 MUKHTAR, H., ELMAMLOUK, T.H. and BEND, J.R. (1978)
Fed. Proc. 37, 270

77 MUKHTAR, H., ELMAMLOUK, T.H., PHIPOT, R.M. and BEND, J.R. (1979)
Mol. Pharmacol. 15, 192-196

78 MÜLLER, R., BECHTELSCHEIMER, H., GEDIGK, P., MARSTELLER, H.J. und LELBACH, W.K. (1975)
Leber Magen Darm 5, 204-208

79 MÜLLER, G. und NORPOTH, K. (1975)
Naturwiss. 62, 541

80 MÜLLER, G., NORPOTH, K. and ECKARD, R. (1976)
Int. Arch. Occup. Environ. Hlth. 38, 69-75

81 OSTERMAN-GOLKAR, S., HULTMAR, D., SEGERBÄCK, D., CALLEMAN, C.J., GÖTHE, R., EHRENBERG, L. and WACHTMEISTER, C.A. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 259-266

82 PALMITER, R.D. (1973)
J. Biol. Chem. 2095-2106

83 PALMITER, R.D. (1974)
Biochemistry 13, 3606-3615

84 PARISH, J.H. (1972)
in: "Principles and Practice of Experiments with Nucleic Acids" (Parish, J.H., ed.)
Longman, London 197

85 POPPER, H., THOMAS, L.B., SCHAFFNER, F., MALTONI, C. and SELIKOFF, I.J. (1977)
in: "Kupffer Cells and Other Sinusoidal Cells" (Wisse, E. and Knook, D.L., eds.) pp 173-181
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1977

86 POPPER, H., THOMAS, L.B., TELLES, N.C., FALK, H. and SELIKOFF, I.J. (1978)
Am. J. Pathol. 92, 349-376

87 "Primary Liver Tumors", (Remmer, H., Bolt, H.M., Bannasch, P. and Popper, H., eds.) (Falk Symposium 25)
MTP Press Ltd., Falcon House, Lancaster, England, 1978

88 RANNUG, U., JOHANSSON, A., RAMEL, C. and WACHTMEISTER, C.A. (1974)
AMBIO 3, 194-197

89 RAVIER, E., DITER, J.M. et PIALAT, J. (1975)
Arch. Mal. Prof. 36, 171-177

90 REMMER, H., GREIM, H., SCHENKMAN, J.B. and ESTABROOK, R.W. (1967)
in: "Methods in Enzymology" (eds. Estabrook, R.W. and Pullman, H.) Vol. X, 703-708
Academic Press, New York (1967)

91 RETY, J., SAUVAGE, T. et HABRARD, A. (1976)
Arch. Mal. Prof. 37, 551-556

92 ROBERTS, B.E. and PATERSON, B.M. (1973)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2330-2334

93 ROEWEKAMP, W.G., HOFER, E. and SEKERIS, C.E. (1976)
Eur. J. Biochem. 70, 259-268

94 SATTSANGI, P.D., LEONARD, N.J. and FRIHART, Ch.R. (1977)
J. Org. Chem. 42, 3292-3296

95 SCHAFFNER, F. (1978)
in: "Primary Liver Tumors" (Remmer, H., Bolt, H.M., Bannasch, P. and Popper, H., eds.) pp 189-199
MTP Press Ltd., Falcon House, Lancaster, England, 1978

96 SCHIMASSEK, H. and GEROK, W. (1965)
Biochem. Z. 343, 407-415

97 SEGLEN, P.O. (1972)
Exptl. Cell Res. 74, 450-454

98 SHEINESS, D., DARNELL, J.E. (1973)
Nature New Biol. 241, 265-268

99 SHERRER, K. and DARNELL, J.E. (1962)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 486-490

100 SLEYSTER, E.Ch., WESTERHUIS, F.G. and KNOOK, D.L. (1977)
in: "Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells"
(Wisse, E. and Knook, D.L., eds.) pp 289-298
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam,
1977

101 SMITH, P.M., WILLIAMS, D.M.J. and EVANS, D.M.D. (1976)
Bull. N.Y. Acad. Med. 52, 447-452

102 THOMAS, L.B., POPPER, H., BERK, P.D., SELIKOFF, I.
and FALK, H. (1975)
N. Engl. J. Med. 292, 17-22

103 UZIEL, M., KOH, Ch.K. and COHN, W.E. (1968)
Anal. Biochem. 25, 77-98

104 VIOLA, P.L. (1970)
X. International Cancer Congress, Houston, Abstr.
Vol. 29

105 VIOLA, P.L., BIGOTTI, A. and CAPUTO, A. (1971)
Cancer Res. 31, 516-519

106 WALDMAN, A.A. and GOLDSTEIN, J. (1973)
Biochemistry 12, 2706-2711

107 WALLNÖFER, H. und ZINNAGEL, N. (1977)
Med. Klin. 72, 410-413

108 WATANABE, P.G., HEFNER, R.E., GEHRING, P.D. (1976)
Toxicology 6, 1-8

109 WATANABE, P.G., MCGOWAN, G.R. and GEHRING, P.J. (1976)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 36, 339-352

110 WATANABE, P.G., MCGOWAN, G.R. and GEHRING, P.J. (1976)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 37, 49-59

111 WATANABE, P.G., ZEMPEL, J.A., PEGG, D.G. and GEHRING, P.J. (1978)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 44, 571-579

112 WEBER, K. and OSBORN, M.J. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412

113 WISSE, E. (1977)
in: "Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells"
(Wisse, E. and Knook, D.L., eds.) pp 33-60
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1977

114 ZIMMERMANN, H. und ECK, H. (1975)
Virchows Arch. (Pathol. Anato.) 368, 51-59

Lebenslauf

Am 3. Jan. 1945 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Hubertus Ottenwälder und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Klemm, in Lauterwasser geboren.

Nach der Ausweisung aus der CSR lebte ich ab 1946 in Stuttgart-Rohr. Dort besuchte ich von 1951 bis 1954 die Grundschule. Von 1954 bis 1964 war ich Schüler des Hegel-Gymnasiums, wo ich im Frühjahr die Reifeprüfung ablegte. Nach dem Studium der Elektrotechnik ab dem Wintersemester 1964/65 an der Technischen Hochschule Stuttgart nahm ich im Wintersemester 1967/68 das Studium der Biochemie an der Universität Tübingen auf, wo ich im September 1968 den ersten Teil und im Oktober 1971 den zweiten Teil der Diplom-Vorprüfung ablegte. Nach dem mündlichen Teil der Diplomprüfung im Wintersemester 1974/75 fertigte ich eine Diplomarbeit mit dem Thema "Zur Präparation von Cuprodoxin" unter den Anleitung von Prof. Dr. U. Weser an.

Ab April 1976 arbeitete ich am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen, wo ich unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt die Dissertation "Untersuchungen zur metabolischen Aktivierung von Vinylbromid und Vinylchlorid" anfertigte.

Meine Akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Anatomie: Mörike; Anorganische Chemie: Rüdorff, Stumpp; Botanik: Bünning; Humanphysiologie: Betz, Jacob; Med. Strahlenkunde: Feine, Kallee; Mikrobiologie: Zähner, Diekmann, Pape; Organische Chemie: Bayer, Kraus, Müller, Opitz, Rieker; Pharmakologie: Remmer, Bolt; Physik: Krüger; Physikalische Chemie: Kortüm, Mauser, Oelkrug; Physiologische Chemie und Biochemie: Flohé, Guglielmi, Hörnle, Probst, Weitzel, Wendel, Wenck, Weser; Zoologie: Möhres, Schwartz.

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf - Tel. 09545/8791